

20. 1994

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID  
FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



\* 5 3 0 9 5 4 1 6 6 X \*  
UNIVERSIDAD COMPLUTENSE

**ACTIVIDAD TIROIDEA EN LARVAS Y ADULTOS DE *Rana perezi*.  
REGULACIÓN POR FACTORES ENDÓGENOS Y AMBIENTALES.**

VºBº

El director

Mercedes Alonso Bedate

Begoña Gancedo Sancho

Memoria presentada por Begoña Gancedo Sancho para  
obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas.

Madrid, 7 de Octubre de 1.994

Esta Tesis Doctoral ha sido realizada en el Departamento de Biología Animal II de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección de la Dr<sup>a</sup>. Mercedes Alonso Bedate y contando con el apoyo económico prestado por las Becas Predoctorales del Rectorado de la Universidad Complutense de Madrid (1990) y del Plan de Formación de Personal Investigador del Ministerio de Educación y Ciencia (1991-1993), y los Proyectos de Investigación CICYT PB 88-0135 y DGICYT PB 91-0400 subvencionados por la Comisión Interministerial de Ciencia y Tecnología.

*A mis Padres*  
*A mi Hermano*

## AGRADECIMIENTOS

Aunque he de confesar que en muchas ocasiones mis fuerzas flaquearon a lo largo de estos años, por fin llegó el momento tan anhelado de escribir estas páginas, que si bien no son de importancia científica, si lo son y mucho, de importancia digamos.....espiritual, porque es aquí y ahora, donde puedo expresar muchos de los sentimientos que he experimentado a lo largo de la elaboración de esta Tesis.

En primer lugar, he de agradecer a la Dra. Mercedes Alonso Bedate la gran confianza que siempre ha depositado en mí, su esfuerzo por comprender mi naturaleza perfeccionista, que no perfecta, y los buenos consejos que me ha dado durante todo este tiempo.

Quiero expresar mi más sincero agradecimiento a la Dra. Gabriella Morreale de Escobar, por sus valiosos consejos y por haberme permitido aprender en su laboratorio las técnicas de extracción y valoración por radioinmunoensayo de las hormonas tiroideas, así como por la amable cesión de las hormonas radioyodadas utilizadas en este trabajo.

Asimismo, quiero agradecer a la Dra. M<sup>a</sup> Jesús Obregón la cesión desinteresada de los anticuerpos empleados en los radioinmunoensayos de hormonas tiroideas.

Gracias a Soco Durán y a M<sup>a</sup> Jesús Presas por su amabilidad y simpatía a la hora de enseñarme las técnicas anteriormente mencionadas.

También quiero agradecer a la Dra. Mónica de la Fuente, como actual Directora del Departamento, su interés y el tiempo que le *robé* con la firma de innumerables papelitos para obtener las consabidas llaves de la Facultad.

A M<sup>a</sup> Jesús, por darme siempre una oportunidad más y preocuparse de mí incluso en los momentos más difíciles, ofreciéndome siempre su amistad, cariño y comprensión. Gracias de corazón.

A Angel Luis, con quién compartí muchos momentos al inicio de esta Tesis, aunque haga tiempo que está muy lejos. Gracias por tu ayuda.

A Nuria, por aguantarme desde sus comienzos en el Departamento, ser mi compañera de fatigas y por su *chispa*.

A Rosa, con cariño, por su ya legendaria, y a veces exasperante, amabilidad y buen corazón.

A Mónica, Dolo y Tito, por compartir conmigo mucho más que el espacio físico y



el tiempo cronológico.

A Ana e Isabel, por su interés y colaboración en los duros momentos del sacrificio, y a Isabel también por su experta ayuda con la histología.

A Alejandro y Manuel, por las fructíferas charlas sobre informática y estadística, y a Manuel también por sufrir resignadamente mis momentos de mal humor.

A Cari y Susana, por no tener en cuenta la poca atención que les presté en ocasiones.

Y a otras muchas personas de esta *santa casa* que me han demostrado su afecto y me han dado ánimos para seguir adelante: Chiky, Gonzalo, M<sup>a</sup> Paz, María, Miguel Angel.....

En cuanto a mí familia...¿qué puedo decir!, han soportado estoicamente mis horarios intempestivos, mis ausencias continuadas, mi falta de colaboración doméstica e incluso de comunicación, y nunca dejaron de creer en mí y de apoyarme hasta el final. Os quiero mucho.

Algunas personas creerán, ya ocurrió en otra ocasión, que tengo mucho que agradecer y a muchas personas, y tienen razón, porque todavía no he terminado. Ni quiero ni puedo olvidar a nadie.

Gracias a Raquel, por escucharme y ser mi amiga en la *jungla* del mundo exterior.

A Piedad, Luis, Pili, Marisa, Valentín, Antonio, Gustavo, Marta, Paula, Marisa, Elena, Maxi, Virginia y Juan Carlos, por su amistad y apoyo, y por entender mis silencios de meses.

A Jim y Nikki, que no han dejado de preocuparse por mi presente y mi futuro desde el momento en que nos conocimos.

Gracias a Denis, por creer en mí desde el principio y tener siempre la palabra de aliento apropiada en el momento justo.

Al Dr. Greg Erickson, por la amable acogida en su laboratorio y por sus enseñanzas.

A Liz, Eva, Rebecca y Alex, por demostrarme que el tiempo y la distancia no son obstáculos para la amistad.

Al Dr. Sakaé Kikuyama (*Kikuyama-sensei*), por darme la oportunidad de aprender un montón de cosas en su laboratorio y estar siempre dispuesto a ayudar.

Gracias a Shaw, por su amistad y por cuidar de mí durante mi estancia en Tokio.

Gracias también a Kawamura-san y Yamamoto-san, por su simpatía y por el tiempo

que emplearon en enseñarme amablemente sus técnicas.

Un recuerdo muy especial a Sakai, que ya no está con nosotros y que me ayudó en una gran parte del trabajo que desarrollé en el laboratorio del Dr. Kikuyama.

A Kaoru, Tamami, Ogu-*chan*, Demi, Suji, Soji, Zen, Keisuke, Takahashi, y todos los demás miembros del laboratorio por ofrecerme su cariño y afianzarme en la creencia de que el idioma no es un problema para la amistad.

Por último, quiero agradecerle a Luis, "aunque no sea necesario", la paciencia que ha derrochado conmigo durante la última fase de esta Tesis. Gracias por estar a mi lado y darme tu cariño.

## ABREVIATURAS

<b>ACTH</b>	Hormona adrenocorticotrópica o corticotropina
<b>AMPc</b>	Adenosín monofosfato cíclico
<b>ANOVA1</b>	Análisis de varianza de una vía
<b>ANOVA2</b>	Análisis de varianza de doble vía
<b>ARNm</b>	Ácido ribonucleico mensajero
<b>ATP</b>	Adenosín trifosfato
<b>ATPasa</b>	Adenosín trifosfatasa
<b>B</b>	Fracción tiroidea unida
<b>CRF, CRH</b>	Factor, hormona liberadora de corticotropina
<b>Cx</b>	Ceguera
<b>5D</b>	5-desyodación o 5-desyodasa
<b>5'D</b>	5'-desyodación o 5'-desyodasa
<b>D</b>	Oscuridad
<b>DA</b>	Dopamina
<b>DIT</b>	Diyodotirosinas
<b>DMEM</b>	Medio de Eagle modificado por Dulbecco
<b>E<sub>2</sub></b>	Estradiol
<b>e.e.m.</b>	Error estándar de la media
<b>F</b>	Fracción tiroidea libre
<b>FSH</b>	Hormona foliculotrópica
<b>G</b>	Tabla de desarrollo de Gosner para larvas de anuros
<b>GH</b>	Hormona del crecimiento
<b>GnRH</b>	Hormona liberadora de gonadotropinas
<b>5-HT</b>	Serotonina
<b>HT</b>	Hormonas tiroideas
<b>ICG</b>	Índice de cuerpos grasos
<b>IGS</b>	Índice gonadosomático
<b>IHS</b>	Índice hepatosomático
<b>IOS</b>	Índice oviductosomático
<b>IOP</b>	Ácido iopanoico
<b>K<sub>d</sub></b>	Constante de disociación
<b>L</b>	Luz

<b>LH</b>	Hormona luteotrópica
<b>MANOVA</b>	Análisis de multivarianza
<b>MEL</b>	Melatonina
<b>MIT</b>	Monoyodotirosinas
<b>MMI</b>	Metimazol
<b>MSH</b>	Melanotropina
<b>NAT</b>	Serotonina N-acetiltransferasa
<b>NF</b>	Tabla de desarrollo de Nieuwkoop-Faber para <i>Xenopus laevis</i>
<b>Ovx</b>	Ovariectomía
<b>PIP<sub>2</sub></b>	Fosfatidil inositol difosfato
<b>P</b>	Progesterona
<b>PRL</b>	Prolactina
<b>PTU</b>	Propiltiouracilo
<b>Px</b>	Pinealectomía
<b>RER</b>	Retículo endoplásmico rugoso
<b>RIA</b>	Radioinmunoensayo
<b>rT<sub>3</sub></b>	3,3',5'-triyodo-L-tironina (T <sub>3</sub> reversa)
<b>SRIH</b>	Somatostatina
<b>T</b>	Testosterona
<b>T<sub>2</sub></b>	3,3'-diyodo-L-tironina
<b>T<sub>3</sub></b>	3,3',5-triyodo-L-tironina
<b>T<sub>4</sub></b>	3,3',5,5'-tetrayodo-L-tironina
<b>TBG</b>	Globulina transportadora de T <sub>4</sub>
<b>TBPA</b>	Prealbúmina transportadora de T <sub>4</sub> o transtiretina
<b>Tetrac</b>	Ácido 3,5,3',5'-tetrayodotiroacético
<b>Tg</b>	Tiroglobulina
<b>TK</b>	Tabla de desarrollo de Taylor y Kollros para <i>Rana pipiens</i>
<b>TLC</b>	Cromatografía líquida en capa fina
<b>TPO</b>	Peroxidasa tiroidea
<b>TRH</b>	Hormona liberadora de tirotropina
<b>Triac</b>	Ácido 3,5,3'-triyodotiroacético
<b>TSH</b>	Hormona liberadora de HT o tirotropina
<b>Tyr</b>	Tirosina

# INDICE

<b>I. INTRODUCCIÓN</b>	1
<b>1. DESCRIPCIÓN MORFOFUNCIONAL DEL TIROIDES</b>	2
1.1. Origen evolutivo del tiroides	2
1.2. Desarrollo ontogénico del tiroides de anfibios anuros	3
1.3. Anatomía del tiroides	7
1.3.1. Macroanatomía	7
1.3.2. Microanatomía	8
1.3.3. Ultraestructura	9
<b>2. LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LOS VERTEBRADOS</b>	10
2.1. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas	11
2.1.1. Captación y oxidación del yoduro	12
2.1.2. Síntesis y transporte de Tiroglobulina	12
2.1.3. Yodación de Tiroglobulina y acoplamiento de yodotirosinas	13
2.1.4. Captación del coloide y liberación y secreción de hormonas tiroideas	14
2.2. Transporte de yodotironinas a los tejidos	15
2.3. Metabolismo de hormonas tiroideas	17
2.3.1. Desyodación	18
2.3.2. Conjugación	23
2.4. Modo de acción de las hormonas tiroideas: Receptores	23
<b>3. EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN ANFIBIOS ANUROS</b>	26
3.1. Larvas	27
3.2. Adultos	32
<b>4. REGULACIÓN DEL EJE TIROIDEO EN ANFIBIOS ANUROS</b>	36
4.1. Regulación endógena	36
4.1.1. Regulación central: Eje hipotálamo-hipófisis-tiroides	36
4.1.2. Regulación periférica: Tejidos diana-desyodasas y receptores	46
4.2. Regulación ambiental	50
4.2.1. Cambios estacionales y diarios en la función tiroidea	50
4.2.2. Efecto de la luz y del fotoperíodo	53
4.2.3. Efecto de la temperatura	55
4.2.4. Efecto de la alimentación	57
<b>II. OBJETIVOS</b>	59

<b>III. MATERIALES Y MÉTODOS</b>	<b>63</b>
1. MATERIALES	64
1.1. Productos	64
1.2. Instrumental	64
1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento	66
1.3.1. Larvas de <i>Rana perezii</i>	67
1.3.2. Animales adultos de <i>Rana perezii</i>	68
2. MÉTODOS	69
2.1. Obtención de muestras	69
2.1.1. Embriones y larvas	69
2.1.2. Extracción de sangre y órganos de individuos adultos	69
2.2. Técnicas quirúrgicas	70
2.2.1. Ovariectomía	70
2.2.2. Pinealectomía	70
2.2.3. Ceguera	72
2.3. Técnicas de microinyección	72
2.4. Técnicas histológicas	73
2.5. Técnicas enzimático-colorimétricas	74
2.5.1. Valoración de glucosa	74
2.6. Técnicas de cultivo estático <i>in vitro</i>	75
2.7. Técnicas radioinmunológicas (RIA)	77
2.7.1. Radioinmunoensayos de hormonas tiroideas	81
2.7.1.1. RIA de triyodotironina	86
2.7.1.2. RIA de tiroxina	88
2.7.2. Radioinmunoensayos de hormonas esteroides	90
2.7.2.1. RIA de estradiol	91
2.7.2.2. RIA de testosterona	92
2.7.2.3. RIA de progesterona	94
2.8. Diseños experimentales	95
2.8.1. Estudio ontogénico de los ciclos diarios de hormonas tiroideas en larvas de <i>R. perezii</i>	96
2.8.2. Ciclos diarios de hormonas tiroideas en adultos de <i>R. perezii</i>	96
2.8.3. Ciclos estacionales de hormonas tiroideas en adultos de <i>R. perezii</i>	98

2.8.4. Regulación endógena de la actividad tiroidea en <i>R. perezii</i> .	
Interacciones con otros ejes neuroendocrinos . . . . .	98
2.8.4.1. Larvas . . . . .	99
2.8.4.2. Adultos . . . . .	102
2.8.5. Regulación ambiental de la actividad tiroidea en <i>R. perezii</i> . Efecto del	
fotoperíodo, la temperatura y la alimentación . . . . .	105
2.8.5.1. Larvas . . . . .	106
2.8.5.2. Adultos . . . . .	107
2.9. Análisis estadístico de los resultados . . . . .	109
2.9.1. Análisis de regresión y correlación . . . . .	109
2.9.2. Test <i>t</i> de Student . . . . .	110
2.9.3. Análisis de la varianza (ANOVA) y test de Duncan de comparaciones	
múltiples . . . . .	111
<b>IV. RESULTADOS . . . . .</b>	<b>114</b>
1. VALIDACIÓN DE LOS RADIOINMUNOENSAYOS (RIAs) . . . . .	115
1.1. Validación de los RIAs de hormonas tiroideas . . . . .	115
1.1.1. Paralelismo . . . . .	115
1.1.2. Recuperación analítica . . . . .	118
1.1.3. Precisión y reproducibilidad . . . . .	122
1.2. Validación de los RIAs de hormonas esteroides . . . . .	128
1.2.1. Valoración de estradiol y testosterona en larvas . . . . .	130
1.2.2. Valoración de progesterona en medio de cultivo . . . . .	130
2. ONTOGENIA DE LOS CICLOS DIARIOS DE HORMONAS TIROIDEAS EN	
<i>R. perezii</i> . . . . .	134
3. CICLOS DIARIOS Y ESTACIONALES DE HORMONAS TIROIDEAS EN	
INDIVIDUOS ADULTOS DE <i>R. perezii</i> . . . . .	140
3.1. Ciclos diarios . . . . .	140
3.2. Ciclos estacionales . . . . .	147
4. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA EN <i>R. perezii</i> .	
INTERACCIONES CON OTROS EJES NEUROENDOCRINOS . . . . .	169
4.1. Larvas . . . . .	169
4.1.1. Control hipotalámico de la actividad tiroidea. Papel del	
CRF . . . . .	169
4.1.2. Relación pineal-tiroides-gónadas . . . . .	181

4.2. Adultos . . . . .	185
4.2.1. Relación pineal-tiroides . . . . .	185
4.2.2. Relación tiroides-gónadas . . . . .	185
5. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA EN <i>R. perezii</i>	204
5.1. Larvas . . . . .	204
5.1.1. Fotoperíodo . . . . .	204
5.1.2. Temperatura . . . . .	204
5.1.3. Alimentación . . . . .	207
5.2. Adultos . . . . .	207
5.2.1. Fotoperíodo . . . . .	207
5.2.2. Temperatura . . . . .	211
5.2.3. Alimentación . . . . .	230
<b>V. DISCUSIÓN . . . . .</b>	<b>235</b>
1. HORMONAS TIROIDEAS EN LA ONTOGENIA DE <i>R. perezii</i> : CICLOS DIARIOS . . . . .	236
2. HORMONAS TIROIDEAS EN ADULTOS DE <i>R. perezii</i> : CICLOS DIARIOS Y ESTACIONALES . . . . .	241
3. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA . . . . .	250
4. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA . . . . .	267
<b>VI. CONCLUSIONES . . . . .</b>	<b>277</b>
<b>VII. BIBLIOGRAFÍA . . . . .</b>	<b>280</b>



## **I. INTRODUCCIÓN**

La glándula tiroidea a través de sus productos hormonales yodados, la tiroxina ( $T_4$ ) y la triyodotironina ( $T_3$ ), juega un importante papel morfogenético durante el desarrollo embriológico de los vertebrados, y durante toda la vida regula numerosos procesos metabólicos. Algunos ejemplos de sus acciones morfogenéticas son sus efectos sobre la diferenciación del sistema nervioso central, y el control de la metamorfosis en anfibios. Las hormonas tiroideas (HT) regulan el consumo de oxígeno de la mayoría de las células del organismo de los animales vertebrados y su presencia es necesaria en todos los tejidos para el desarrollo de una fisiología normal debido a su intervención en el metabolismo de proteínas, lípidos e hidratos de carbono.

## 1. DESCRIPCIÓN MORFOFUNCIONAL DEL TIROIDES.

La glándula tiroidea fue descrita de manera casual por Galeno y más detalladamente por Vesalius en 1543. El nombre de la glándula procede del griego y significa "escudo oblongo" debido a la localización de la glándula en humanos, ya que se sitúa en la laringe adosada al cartílago tiroideo que tiene forma de escudo (véase Dent, 1986).

### 1.1. Origen evolutivo del tiroides.

Los protocordados, ancestros inmediatos de los vertebrados, poseen un canal ciliado en el suelo de la faringe llamado **endostilo**. El endostilo, además de células que secretan sustancias mucosas a las que se adhieren las partículas alimenticias, posee otras células que unen yodo. En este sentido, puede considerarse al endostilo y al tiroides como estructuras claramente relacionadas (Dent, 1986).

Dentro de los protocordados, en los tunicados se han detectado residuos tirosilo yodados,  $T_4$  (Barrington y Thorpe, 1965), monoyodotirosinas (MIT) y diyodotirosinas (DIT) (Dunn, 1975). Por otra parte, los cefalocordados, el otro grupo importante de protocordados, tanto adultos como larvas son capaces de sintetizar y liberar HT (Tong *et al.*, 1962; Fredrickson *et al.*, 1984).

La conexión filogenética del tiroides entre los protocordados y los vertebrados se puso de manifiesto cuando se descubrió que las larvas de lampreas, pertenecientes al grupo más primitivo de vertebrados, los ciclóstomos, estaban provistas de un endostilo que durante la metamorfosis se transformaba en la glándula tiroidea del adulto (Dent, 1986).

La glándula tiroidea se caracteriza por su gran estabilidad evolutiva, manteniéndose la estructura del folículo desde el momento de su aparición en los ciclóstomos más primitivos y a lo largo de toda la línea evolutiva de los vertebrados.

## 1.2. Desarrollo ontogénico del tiroides de anfibios anuros.

Existen diversas tablas de desarrollo de anfibios anuros entre las que se han establecido correspondencias (Tabla i) para comparar los estados en diferentes especies (Dodd y Dodd, 1976; Burggren y Just, 1992). La ontogenia del tiroides se conoce con bastante detalle en *Xenopus laevis*, por lo que nos basaremos fundamentalmente en los estados de Nieuwkoop y Faber (NF, 1967) para la descripción de los cambios que acontecen durante la misma.

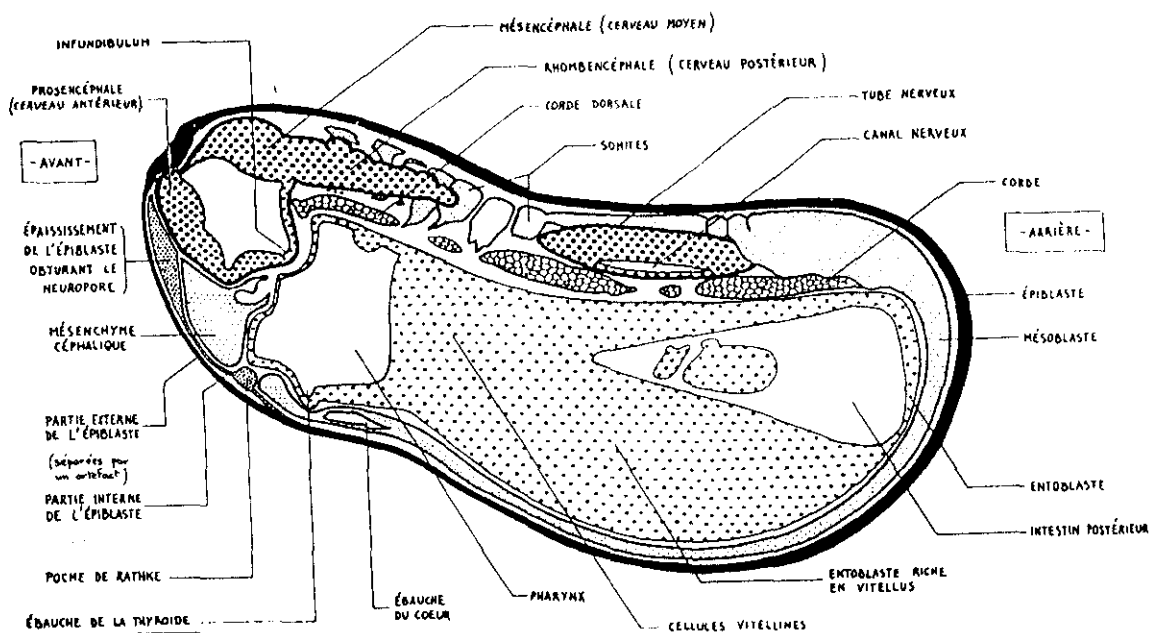
El desarrollo o metamorfosis de anfibios anuros se divide clásicamente en tres períodos: premetamorfosis, prometamorfosis y clímax (Etkin, 1968). Los estados incluidos en cada una de estas fases varían dependiendo de los autores y las especies referidas, nosotros utilizaremos la terminología adoptada por Dodd y Dodd (1976) según la cual los estados embrionarios (1-45 NF) serían previos a la **premetamorfosis** (46-54 NF), durante la que se produce un considerable crecimiento de las larvas y un desarrollo inicial y limitado de las extremidades posteriores, considerado generalmente independiente de la función tiroidea. El desarrollo posterior es dependiente del tiroides. La **prometamorfosis** (55-57 NF) se caracteriza por el rápido crecimiento de las extremidades posteriores. Finalmente, el **clímax** (58-66 NF) es la fase más corta, durante la que se producen los dramáticos cambios morfológicos y bioquímicos asociados a la metamorfosis (Dodd y Dodd, 1976).

En los vertebrados, en general, el primordio tiroideo hace su aparición durante la diferenciación temprana de la faringe. En los anfibios (Ilustr. 1) surge a nivel de la primera bolsa visceral, como una protusión caudal del suelo buco-faríngeo en forma de dedo (33-34 NF). Posteriormente crece por debajo de la piel ventral como una fina cadena de células (35-36 NF). La porción más caudal se engrosa (37-38 NF) y se bifurca en dos lóbulos (el primordio tiroideo propiamente dicho) cerca del punto de ramificación del tronco arterioso (39 NF). El resto del primordio original conecta el primordio tiroideo con el epitelio del suelo buco-faríngeo en forma de una cadena sólida de células, el tracto tirogloso.

El primordio tiroideo forma dos cadenas longitudinales a lo largo de las ramas del tronco y pierde la conexión con el tracto tirogloso medio (40 NF). En cada cadena longitudinal de células aparece un engrosamiento en forma de nódulo que será el primordio

**Tabla i.** Comparación de los estados de desarrollo de larvas de anuros según las tablas normalizadas de *Xenopus laevis* (Nieuwkoop y Faber, 1967; NF), *R. pipiens* (Taylor y Kollros, 1946; TK) y anuros en general (Gosner, 1960; G). La terminología utilizada para la división de la metamorfosis en las distintas fases es la adoptada por Dodd y Dodd (1976).

	<u><i>X. laevis</i></u>	<u><i>R. pipiens</i></u>	<u>Anuros</u>
	1-45	--	1-25
<b>Premetamorfosis</b>			
	46	I	26
	47-48	II	
	49-50	III	27-28
	51	IV	29
	52	V	30
		VI	31
	53	VII	32
		VIII	33
	54	IX	34
		X	35
<b>Prometamorfosis</b>			
	55	XI	36
		XII	
	56-	XIII	37
	56+	XIV	
	57	XV	38
		XVI	39
	57+	XVII	40
<b>Clímax</b>			
	58	XVII+	
	59	XVIII	41
	59+		
	60		
	61	XIX	
	62	XX	42
		XXI	43
	63		
	63+	XXII	44
	64	XXIII	
	65	XXIV	45
	66	XXV	46



**Ilustr. 1.** Corte sagital de una neurula de *Rana* mostrando el esbozo del tiroides (tomado de Freeman y Bracegirdle, 1967).

de la glándula tiroidea definitiva, la zona proximal del tracto tirogloso desaparece (41 NF) y el resto desaparece cuando el primordio se sitúa a ambos lados de la cresta hioidea (43 NF). En los siguientes estados aumenta el engrosamiento y en el estado 48 NF las cadenas celulares se han transformado en lóbulos difusos (4-6) que posteriormente empiezan a formar **folículos** (48-49 NF), no obstante, el epitelio folicular que rodea el primer coloide formado está todavía incompleto.

Los primeros folículos completos aparecen en el estado 51 NF, en el que cada glándula contiene aproximadamente trece folículos. Aparecen las vacuolas de reabsorción que serán numerosas en el estado 52 NF. En este período las masas coloidales aumentan de tamaño. A continuación, el número de folículos se incrementa hasta unos veinte (53 NF), el tejido conjuntivo interfolicular aumenta y la glándula se rodea de una cápsula bien definida (54 NF). Por último, el epitelio plano original cambia hacia un epitelio de tipo cúbico y llega a ser columnar (56 NF).

A lo largo de la metamorfosis de anuros se produce un aumento en la cantidad de retículo endoplásmico rugoso (RER) y del aparato de Golgi en las células foliculares de la glándula tiroidea, presumiblemente asociado a la síntesis y secreción de hormonas tiroideas (Duellman y Trueb, 1986).

En cuanto a la producción de HT durante la ontogenia, salvo pequeñas diferencias, en general está aceptado que en *R. catesbeiana* la  $T_4$  plasmática es muy baja o no detectable durante la premetamorfosis y se eleva durante la prometamorfosis para alcanzar un máximo en el clímax. Los primeros trabajos, basados en la adición de hormonas exógenas y valoración de yodo unido a proteínas (Etkin, 1968; Just, 1972), sugerían que este aumento se producía abruptamente al inicio del clímax (XIX-XXI TK; Taylor y Kollros, 1946; véase Tabla i). Estudios posteriores que aplicaban técnicas más sensibles (radioinmunoensayo, RIA), indican que el máximo se alcanza en el estado XXIII TK, es decir hacia la última mitad del clímax (Miyauchi *et al.*, 1977; Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981).

En otras especies de ránidos (*Rana esculenta*: Schultheiss, 1980; *Rana clamitans*: Weil, 1986) se han observado resultados similares, aunque en *R. clamitans* los niveles de  $T_4$  plasmática fueron moderadamente altos al inicio de la prometamorfosis (X-XIII TK), en contraste con los anteriores trabajos, y descendían en los estados XIV-XV TK para alcanzar el máximo en el estado XXIII TK (Weil, 1986). En cuanto a la  $T_3$  plasmática, el patrón es similar al de  $T_4$  en *R. catesbeiana* (Regard *et al.*, 1978) y *R. esculenta* (Schultheiss, 1980).

En *Xenopus*, los niveles de  $T_4$  aumentan gradualmente desde los últimos estados de la premetamorfosis alcanzando valores máximos en la mitad del clímax, mientras que el aumento en  $T_3$  está ligeramente retrasado con respecto al de  $T_4$  (Leloup y Buscaglia, 1977; Buscaglia y Leloup, 1980). Se han descrito los cambios en la concentración de HT a lo largo de la metamorfosis de *Bufo japonicus* (Niinuma *et al.*, 1991), encontrándose un patrón similar al descrito anteriormente. Así, durante la premetamorfosis los niveles de  $T_3$  y  $T_4$  son inferiores al límite de detección del ensayo. Niveles detectables de  $T_4$  aparecen en prometamorfosis temprana, mientras que la  $T_3$  aparece un poco más tarde, hacia la mitad de la prometamorfosis. Por último, la máxima concentración de  $T_4$  y  $T_3$  se observa al principio y hacia la mitad del clímax, respectivamente. Recientemente, también se ha estudiado la evolución de los cambios en la concentración y el contenido total de HT en *Bufo marinus* (Weber *et al.*, 1994), detectándose la presencia de HT en estados embrionarios.

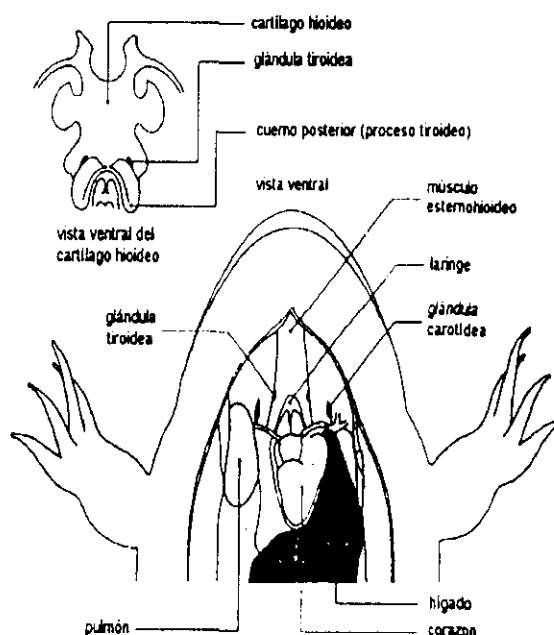
Los resultados obtenidos en anfibios urodelos (*Ambystoma tigrinum*: Larras-Regard *et al.*, 1981; *Eurycea bislineata*: Alberch *et al.*, 1986) concuerdan con lo descrito anteriormente para anuros. En este sentido, la concentración de HT empieza a aumentar en la prometamorfosis y se eleva rápidamente durante el clímax. En premetamorfosis y adultos, los niveles de HT fueron indetectables. El ajolote (*Ambystoma mexicanum*) es un urodelo

neoténico que raramente experimenta metamorfosis espontánea, aunque puede ser inducida mediante la administración de HT. En el ajolote se han descrito niveles de  $T_4$  en plasma muy bajos (Darras y Kühn, 1983, 1984). Otros autores, sin embargo encontraron niveles altos durante el período de desarrollo de las extremidades posteriores (Rosenkilde *et al.*, 1982). Recientemente, se han obtenido datos que confirman la relación causal entre los bajos niveles de  $T_4$  y la neotenia (Galton, 1992), sugiriendo que las diferencias observadas en los estudios previamente publicados son consecuencia de las distintas metodologías aplicadas en la valoración de  $T_4$ .

### 1.3. Anatomía del tiroides.

#### 1.3.1. MACROANATOMÍA.

La glándula tiroidea de los anfibios anuros está constituida por dos lóbulos aplastados de forma triangular completamente separados (Ilustr. 2). Cada lóbulo se encuentra rodeado por una fina cápsula de tejido conjuntivo translúcido y están localizados en ambos extremos del músculo esternohioideo, siendo otras estructuras limítrofes el cuerpo carotideo y el nervio hipobranquial (Suzuki, 1992). En anuros las glándulas normalmente están estrechamente asociadas al cartílago hioideo (véase Ilustr 2), cerca de la tráquea, estando a menudo firmemente unidas al cartílago por tejido conjuntivo (Gorbman, 1964).



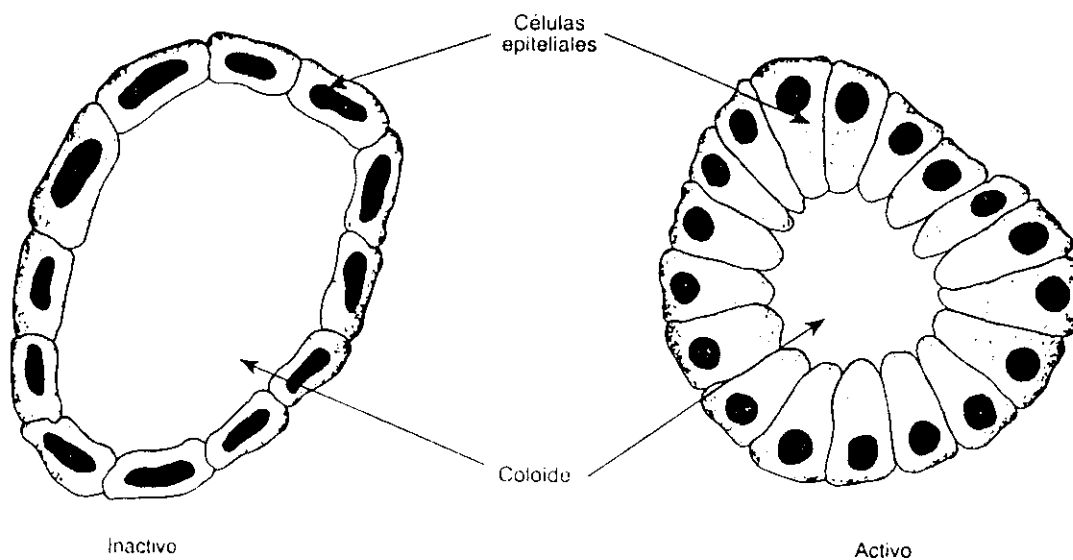
**Ilustr. 2.** Diagrama mostrando la situación de las glándulas tiroideas en *Rana catesbeiana* (Suzuki, 1992).

De forma similar a lo que ocurre en mamíferos, el aporte vascular del tiroides deriva de una rama de la arteria carótida externa que constituye la arteria tiroidea. La glándula está atravesada por una rica red capilar. El drenaje venoso se realiza a través de la vena tiroidea que desemboca en la vena yugular externa (Duellman y Trueb, 1986). Existe una estrecha relación entre el tiroides y el sistema linfático (LiVolsi, 1992).

Cada glándula está innervada por el hipogloso (par craneal XII) (Duellman y Trueb, 1986) y se cree que la secreción tiroidea está bajo la influencia, tanto de señales neurales directas, como de señales indirectas procedentes de nervios vasomotores (véase LiVolsi, 1992).

### 1.3.2. MICROANATOMÍA.

La estructura microscópica del tiroides de anfibios, tanto adultos como larvas, es indistinguible de la de otros vertebrados (Gorbman, 1964; Dodd y Dodd, 1976). Consta de numerosos folículos, de forma normalmente ovoide o esférica, que representan la unidad funcional básica de la glándula tiroidea, y están constituidos por un epitelio monoestratificado de células basófilas o células foliculares que definen un espacio interno o lumen en el que se acumula un fluido viscoso que recibe el nombre de coloide (Ilustr. 3). Cada folículo está cubierto de un fino tejido conjuntivo laxo y rodeado de una red de capilares sanguíneos (Suzuki, 1992). Las células foliculares presentan una polaridad definida con el ápice dirigido hacia el lumen y la base orientada hacia el exterior del folículo y delimitada por la membrana basal que se encuentra en contacto con los capilares sanguíneos fenestrados (LiVolsi, 1992).



**Ilustr. 3.** Folículos tiroideos de glándulas consideradas inactivas y activas (tomado de Escobar *et al.*, 1992).



En los mamíferos el coloide tiene un aspecto claro y homogéneo, a excepción de la presencia de algunos restos celulares y algún macrófago (Dent, 1986) y está compuesto mayoritariamente por la **tiroglobulina** (Tg), yodoglucoproteína a partir de la cual se sintetizan las hormonas tiroideas (Cody, 1984). También se ha observado la presencia de otras proteínas, eritrocitos (Zeligs y Wollman, 1977) y cristales de oxalato cálcico (Richter y McCarty, 1954).

El carácter del coloide, la altura del epitelio y el diámetro de los vasos sanguíneos presentan variaciones dependiendo del estado funcional de la glándula, aunque el aspecto histológico del tiroides no siempre refleja el estado de actividad biosintética del mismo (Dickhoff y Darling, 1983). En este sentido, la altura del epitelio muestra pronunciados cambios a lo largo de la metamorfosis de los anfibios que, sin embargo, no está necesariamente asociado a un aumento en la biosíntesis de hormonas (Dodd y Dodd, 1976). Generalmente, en la fase activa el epitelio folicular es más alto adquiriendo forma columnar y el lumen se ve reducido. En la zona del coloide adyacente al epitelio aparece un gran número de pequeñas vacuolas o lagunas de reabsorción, siendo frecuente la aparición de gotas de coloide en el citoplasma epitelial (Dent, 1986). Algunos folículos están generalmente fuera de fase con respecto al estado de estimulación de la mayoría de los folículos de una glándula concreta debido al origen policlonal de las células foliculares.

### **1.3.3. ULTRAESTRUCTURA.**

La mayor parte de los estudios se han realizado en tiroides de mamíferos, si bien los escasos estudios realizados en otros vertebrados han revelado una gran similitud desde el punto de vista estructural y bioquímico (Dodd y Dodd, 1976; Dent, 1986; George y John, 1990), con la excepción de las células parafoliculares o células C productoras de calcitonina que sólo aparecen en el espacio interfolicular en mamíferos, mientras que en el resto de los vertebrados tienen otras localizaciones independientes del tejido tiroideo, como el órgano ultimobranquial.

Los núcleos de las células foliculares se sitúan centralmente y la porción apical de estas células aparece tapizada de microvellosidades que se proyectan hacia el lumen del folículo. También se observan de uno a cuatro cilios que se proyectan a partir de la porción media de cada célula folicular. Dentro del citoplasma celular se encuentran abundantes liposomas y pequeñas mitocondrias redondeadas y alargadas estrechamente asociadas al RER. Cerca del lumen se observan desmosomas y uniones terminales bien desarrolladas entre las

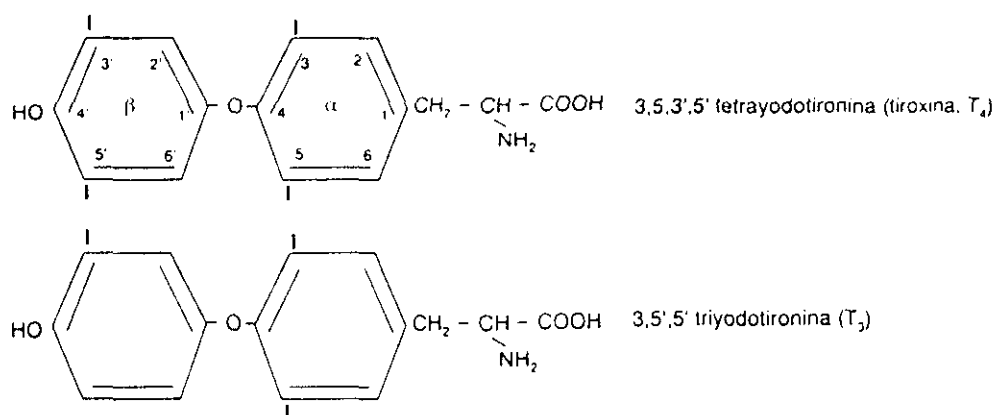
células. En el espacio intersticial se encuentran capilares fenestrados y fibras de colágeno (LiVolsi, 1992).

El RER ocupa la mayor parte de las regiones basal y paranuclear y se encuentra asociado al aparato de Golgi que a su vez se relaciona con vesículas exocitóticas (Ekholm, 1990). Los cambios en tamaño y volumen de las células foliculares observados a lo largo de la prometamorfosis y el clímax parecen estar fundamentalmente en función de la cantidad de RER (Dodd y Dodd, 1976). Ocasionalmente se observan microtúbulos y microfilamentos en el citoplasma de los pseudópodos que se observan en el extremo apical de las células y que parecen estar implicados en la captación del coloide (Gabrion *et al.*, 1980). Por último, también se encuentran abundantes lisosomas que se fusionan con las gotas de coloide para hidrolizar la Tg (Herzog, 1984).

En cuanto a las enzimología ultraestructural, se ha identificado la presencia de diversas enzimas en las células foliculares del tiroides de larvas de anfibios, entre las que destacan la fosfatasa ácida, fosfatasa alcalina y peroxidasa (véase Dodd y Dodd, 1976).

## 2. LAS HORMONAS TIROIDEAS EN LOS VERTEBRADOS.

La estructura básica de las HT es la de dos anillos bencénicos unidos por un puente de oxígeno, uno de los cuales tiene una cadena de alanina y otro un grupo fenilo, ambos en posición *para* respecto a dicho puente (Ilustr. 4). Esta estructura es la del aminoácido aromático tironina. Las diferentes posiciones de los carbonos del anillo interno (el alanínico o anillo  $\alpha$ ), se numeran del 1 al 6 empezando por el carbono de unión a la alanina. Los carbonos del anillo fenólico (anillo  $\beta$ ), se numeran del 1' al 6', empezando por el del puente

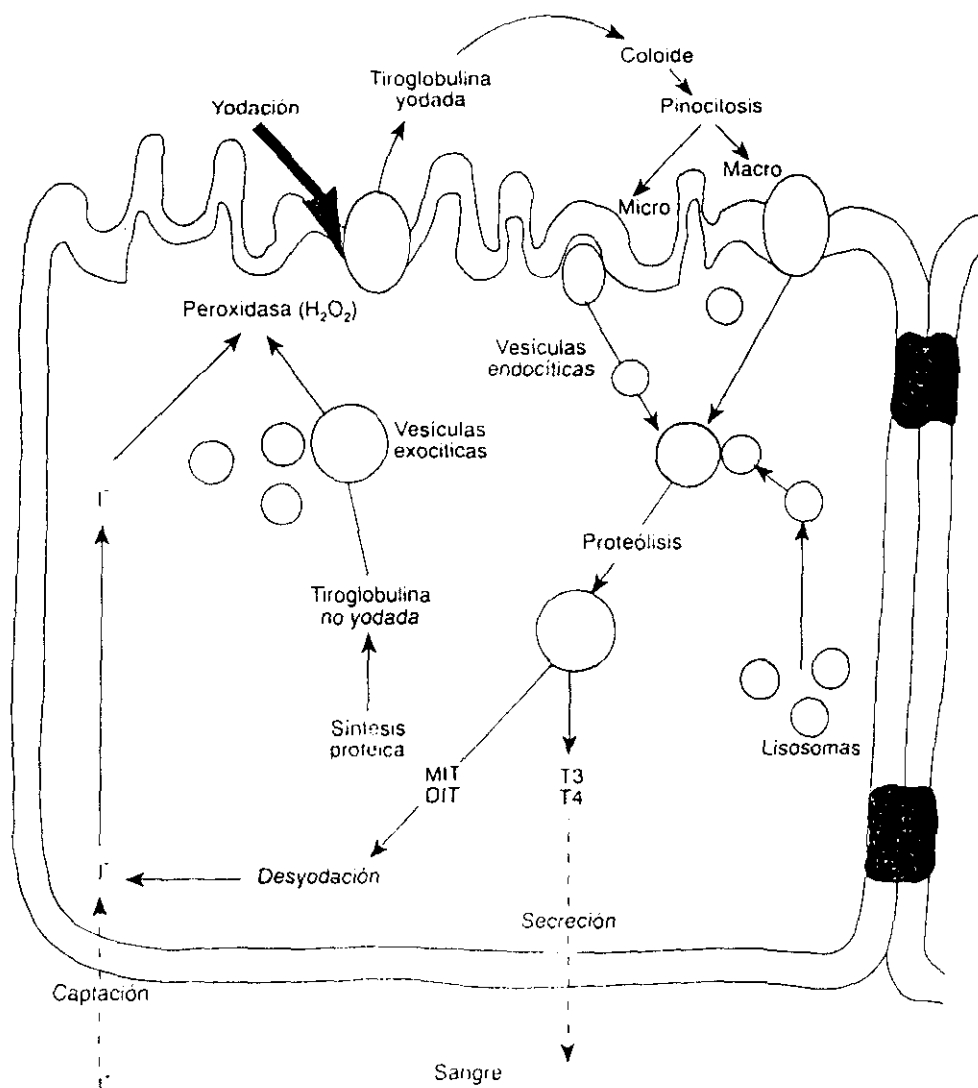


**Ilustr. 4.** Química y nomenclatura de las hormonas tiroideas (modificado de Escobar *et al.*, 1992).

de oxígeno. Debido a constricciones espaciales los átomos de yodo sólo se encuentran en las posiciones 3, 5, 3' y 5', en número máximo de cuatro, siendo las formas naturales de la  $T_3$  y la  $T_4$  las formas levóginas (Escobar *et al.*, 1992).

### 2.1. Síntesis y secreción de hormonas tiroideas.

La síntesis de HT (Ilustr. 5) se puede dividir en varias etapas: 1) captación de yoduro ( $I^-$ ) del torrente sanguíneo, 2) oxidación del yoduro a yodo activo ( $I_2$ ), 3) síntesis y transporte de Tg al lumen folicular, 4) yodación de la Tg, 5) acoplamiento de yodotirosinas, 6) captación del coloide por las células foliculares, 7) procesamiento e hidrólisis de Tg y por último 8) liberación y secreción de HT. Con el propósito de hacer más ágil la exposición, a continuación se tratarán en un mismo apartado varias etapas relacionadas.



**Ilustr. 5.** Esquema del proceso de síntesis, liberación y secreción de las hormonas tiroideas (tomado de Escobar *et al.*, 1992).

### **2.1.1. CAPTACIÓN Y OXIDACIÓN DEL YODURO.**

La funcionalidad de la glándula tiroidea depende de la disponibilidad de yodo, que en el caso de los animales terrestres, incluidos los anfibios, puede ser difícil de obtener en cantidades adecuadas, ya que la dieta (agua y alimentos) constituye la única fuente natural de este oligoelemento. Los mecanismos de captación de yodo a partir del ambiente, se desarrollaron pronto en los organismos animales, dada la relativa abundancia de este elemento en el medio marino que ocupaban las primeras especies. Por todo ello, la glándula tiroidea ha desarrollado la capacidad, no sólo de secuestrar, sino también de concentrar yodo. Otras células del mismo origen embrionario que las células foliculares tiroideas también son capaces de concentrar yodo en forma de yoduro.

En los anfibios, la captación y acumulación de yoduro comienza al inicio de la foliculogénesis y parece que estos procesos son propiedades básicas de las células tiroideas independientes de la tirotropina u hormona estimulante del tiroides (TSH). También se produce una acumulación de yoduro en el intestino, que podría pasar a disponibilidad de la glándula durante el clímax, momento en que la captación de yodo disminuye, y ser importante en ambientes pobres en yodo (Dodd y Dodd, 1976).

La concentración de yoduro en la glándula tiroidea es muy elevada (de 25 a 500 veces el nivel circulante). Obviamente tales niveles no se consiguen por difusión pasiva, sino que en la membrana plasmática basal existe una poderosa bomba que transporta yoduro en contra de gradiente (Chow *et al.*, 1982) y que, por tanto, requiere energía.

La oxidación del yoduro se lleva a cabo en presencia de peróxido de hidrógeno (receptor de electrones) y está catalizada por una peroxidasa que parece ser la misma que cataliza la yodación de Tg y el acoplamiento de yodotirosinas para formar las HT (Taurog, 1979; Nuñez, 1980).

### **2.1.2. SÍNTESIS Y TRANSPORTE DE TIROGLOBULINA.**

La Tg es una glucoproteína homodimérica de 660.000 daltons. Su síntesis comienza en el núcleo, donde el ARNm precursor se transcribe y sufre poliadenilación, y probablemente encapuchamiento o "capping", antes de ser procesado y transportado al citoplasma (Van Herle *et al.*, 1979). El centro molecular de la Tg se forma en los polisomas del RER y pasa al interior de sus cisternas donde comienza la glucosilación. Posteriormente, se sintetizan cadenas de carbohidratos que se transfieren al centro molecular, añadiéndose,

por último, ácido siálico y otros residuos de carbohidratos a la molécula (Spiro y Spiro, 1985). La glucosilación se completará en el aparato de Golgi.

En el citoplasma apical de las células foliculares se encuentran una gran variedad de vesículas, algunas de las cuales contienen únicamente Tg (Ericson, 1981), mientras que otras son vesículas exocitóticas que transportan la Tg recién sintetizada junto a la peroxidasa hacia el lumen folicular, estando implicados los microtúbulos de los pseudópodos (Ericson, 1980).

Parece que la síntesis de Tg se inicia al final del período embrionario en *X. laevis* y *B. japonicus* (Hanaoka *et al.*, 1973).

### **2.1.3. YODACIÓN DE TIROGLOBULINA Y ACOPLAMIENTO DE YODOTIROSINAS.**

La Tg es el sustrato de la peroxidasa, normalmente denominada peroxidasa tiroidea o **TPO**, que es una hemoproteína de membrana con un peso molecular de 93.000 daltons. La TPO, como hemos citado anteriormente, cataliza dos pasos de la biosíntesis de HT (véase Ilustr. 5): la yodación de los residuos tirosilo en la Tg, dando lugar a la formación de MIT y DIT y el acoplamiento posterior, bien de dos DIT para formar  $T_4$  (3,3',5,5'-tetrayodotironina), que es el principal producto hormonal del tiroides, o de una MIT y una DIT para dar origen a la triyodotironina (3,3',5-triyodotironina,  $T_3$ ) y a la  $T_3$  reversa (3,3',5'-triyodotironina,  $rT_3$ ), cuantitativamente menos importantes. Por último, también se forma una cantidad mínima de diyodotironina (3,3'-diyodotironina,  $T_2$ ) (Visser, 1988).

Para explicar la actividad catalítica yoduro-dependiente de la TPO, se ha propuesto un mecanismo de yodación de la tirosina (Tyr) que implicaría la formación de un intermediario activo que sería un complejo enzima-hipoyoduro (véase Cody, 1984). Se ha demostrado que la estructura tridimensional de la Tg desempeña un papel esencial en la síntesis de HT. Sólo algunos residuos tirosilo específicos son reconocidos por la TPO y, por tanto, generadores de HT (Mercken *et al.*, 1985). En *R. catesbeiana*, cuya Tg es muy parecida a la bovina, se ha identificado a la Tyr<sup>130</sup> como un sitio generador de HT (Hayashi *et al.*, 1991), como ocurre en la Tg humana (Marriq *et al.*, 1991). Por otra parte, la TPO es también una glucoproteína, y se ha observado que la desglucosilación de esta enzima induce una modificación de la estructura terciaria que afecta al centro activo y como consecuencia, inhibe la actividad enzimática (Long *et al.*, 1991; Giraud *et al.*, 1992).

#### **2.1.4. CAPTACIÓN DE COLOIDE Y LIBERACIÓN Y SECRECIÓN DE HORMONAS TIROIDEAS.**

El coloide conteniendo la Tg es captado del lumen folicular mediante dos procesos denominados macro- y micropinocitosis (Ericson, 1981). La **macropinocitosis** conduce a la formación de grandes vesículas de reabsorción denominadas gotas de coloide, mientras que la micropinocitosis pone en juego pequeñas vesículas recubiertas (véase Ilustr. 5).

El proceso de macropinocitosis es muy parecido al de la fagocitosis y se caracteriza por la formación de pseudópodos que se extienden hacia el lumen e internalizan una fracción del coloide cuando se retraen. Este mecanismo se produciría fundamentalmente para captar grandes cantidades de Tg en situaciones de emergencia metabólica. Por el contrario, la **micropinocitosis** o endocitosis, a través de la formación de vesículas recubiertas o de clatrina (Bernier-Valentin *et al.*, 1990), sería responsable de la internalización de Tg para asegurar la producción hormonal de la glándula tiroidea en estado de equilibrio o en respuesta a variaciones fisiológicas de TSH (Rousset, 1991). Este proceso además podría ser selectivo (Rousset y Mornex, 1991), de modo que las moléculas de Tg más yodadas o maduras serían internalizadas preferentemente.

Está admitido que la Tg internalizada en forma de gotas de coloide permanece en las vacuolas para ser hidrolizada. Las enzimas hidrolíticas son aportadas por los lisosomas que se fusionan con las gotas de coloide dando lugar a los fagolisosomas o lisosomas secundarios. En cuanto a la Tg captada por endocitosis, es detectada primero en los endosomas tempranos y posteriormente en los endosomas tardíos o prelisosomas (Kostrouch *et al.*, 1991).

La liberación de T<sub>4</sub> y T<sub>3</sub> parece requerir la acción concertada de diferentes endo- y exopeptidasas (Dunn y Dunn, 1988); de forma que la Tg, probablemente en los prelisosomas, estaría sometida a reacciones selectivas de procesamiento, estando esta selectividad determinada por la estructura de la Tg (Rousset, 1991).

Finalmente, las HT liberadas pasarían, presumiblemente por difusión, al citoplasma y a través de la membrana basal folicular al torrente circulatorio. También se secreta una cierta cantidad de Tg (Dent, 1986; Verschueren *et al.*, 1991; Tegler *et al.*, 1993). Recientemente, se han descrito los niveles circulantes de Tg en larvas e individuos adultos de *R. catesbeiana*, encontrándose que estos niveles evolucionan de forma paralela a lo observado para los niveles circulantes de HT a lo largo de la metamorfosis (Suzuki y Fujikura, 1994). Estos autores sugieren que esta Tg, como ha sido postulado previamente en mamíferos, podría ser Tg recién sintetizada (baja glucosilación y baja yodación) que es

directamente secretada al torrente circulatorio sin pasar al lumen folicular. La secreción de Tg sería una función preferente en el tiroides de *R. catesbeiana*, puesto que en el estado XX TK se encuentran altos niveles de Tg circulante (Suzuki y Fujikura, 1994) junto con bajos niveles de HT plasmáticas (Suzuki y Suzuki, 1981). Por otra parte, parece ser que la secreción de Tg podría tener lugar a través de mecanismos de exocitosis (Van Herle, 1985), lo que sugiere que las propias HT podrían secretarse de la misma forma.

## 2.2. Transporte de yodotironinas a los tejidos.

Recientemente se ha reconocido la posibilidad de que las **proteínas plasmáticas** transportadoras de yodotironinas desempeñen un papel importante en la captación celular de HT (Henneman y Docter, 1990), habiéndose descrito, en contra de lo que se creía, efectos de la  $T_4$  dependiente de la concentración total, y no de la fracción libre plasmática, de esta hormona (Kvetny y Matzen, 1990).

Las tres principales proteínas que transportan  $T_4$  y  $T_3$  en humanos son la globulina transportadora de  $T_4$  (TBG), la prealbúmina transportadora de  $T_4$  o transtiretina (TBPA) y la albúmina, que difieren en concentración y afinidad por las hormonas (Robbins y Edelhoch, 1986).

Datos recientes sugieren que la transtiretina, presente también en aves, es una de las proteínas plasmáticas más conservadas en la evolución y que podría desempeñar un papel fundamental en el transporte de HT de la sangre al cerebro (Duan *et al.*, 1991).

En peces se ha demostrado que, al igual que ocurre en mamíferos, una proporción muy pequeña de  $T_4$  y  $T_3$  circulan libres en el plasma, y además parece que la  $T_3$  se une con más fuerza que la  $T_4$  a estas proteínas (Eales, 1985; Eales y Shostak, 1985). Larsson y colaboradores (1985) concluyeron que en plasma de salmón no existe TBG pero sí aparece un análogo de la TBPA humana. Por otra parte, recientemente se ha demostrado que las principales proteínas transportadoras de HT en plasma de trucha son las lipoproteínas, fundamentalmente las de alta densidad independientemente del estado nutricional, mientras que la unión a lipoproteínas de muy baja densidad es dependiente de su concentración y, por tanto, del estado nutricional. Se observó también que  $T_3$  y  $T_4$  se unen a la vitelogenina que es una proteína de muy alta densidad que podría transferir las HT al vitelo de los ovocitos (Babin, 1992).

También se ha descrito la existencia de proteínas transportadoras de HT en otros vertebrados poiquilothermos. En reptiles, se ha encontrado que la proteína(s) transportadoras

de HT están presentes en baja concentración en el plasma de *Pseudemys scripta*, con lo que los niveles totales de  $T_4$  en plasma son superiores a los típicamente encontrados en mamíferos y la tortuga podría poseer una proteína transportadora (TBP) única que sería funcionalmente análoga a la TBG (Licht *et al.*, 1990a). Una proteína similar fue posteriormente identificada en otro género de la misma familia de tortugas, pero no aparecía en otras familias de quelonios (Licht *et al.*, 1991a). Licht y Pavgi (1992) han purificado y caracterizado una proteína transportadora de  $T_4$  de alta afinidad y baja capacidad que no es albúmina ni prealbúmina en el plasma de otra tortuga, *Trachemys scripta*. En principio, parecía que esta proteína era similar a la TBG de mamíferos, aunque la capacidad de unión de  $T_4$  era mayor, quizás debido a que la concentración de albúmina es menor y no posee TBPA (Glennemeier y Licht, 1993). Sin embargo, parece ser que esta proteína en realidad es muy similar a la proteína transportadora de vitamina D (DBP) de mamíferos, y que en esta familia de quelonios transporta tanto  $T_4$  como vitamina D (Licht, 1994a), siendo, de hecho, la principal transportadora de este último compuesto. Posteriormente, se ha observado que, a pesar de que otros reptiles, así como anfibios, aves y mamíferos presentan una actividad DBP, sólo algunos reptiles y aves presentaron reacciones cruzadas con la proteína TBP/DBP de *T. scripta* (Licht, 1994b).

En anfibios, se ha observado la existencia de proteínas transportadoras de HT en el plasma de *R. catesbeiana* (Miyauchi *et al.*, 1977; Galton, 1980b; Yamauchi *et al.*, 1993). Dos proteínas diferentes se han encontrado a lo largo de la metamorfosis de *R. catesbeiana*, una que aparece en los estados previos al clímax y otra que aparece en las últimas fases del clímax y está presente también en el adulto. Parece ser que esta proteína es similar a la prealbúmina de mamíferos, sin embargo su afinidad es mucho mayor para  $T_3$  que para  $T_4$ , pudiendo desempeñar un papel importante en el transporte de  $T_3$  en sangre durante la metamorfosis (Yamauchi *et al.*, 1993). También se ha demostrado la existencia de una proteína parecida a la TBPA, pero no de TBG, en el suero de *Bufo regularis* (Larsson *et al.*, 1985). Por el contrario, otros estudios realizados en *Bufo marinus* indican que esta proteína tipo TBPA se produce fundamentalmente en el plexo coroideo y presenta niveles circulantes muy bajos, sugiriendo que su papel en el transporte de  $T_4$  en sangre no sería muy importante (Harms *et al.*, 1991).

Teniendo en cuenta el carácter hidrofóbico de las yodotironinas generalmente se asume que penetran en los tejidos por simple difusión. Sin embargo, cada vez hay más

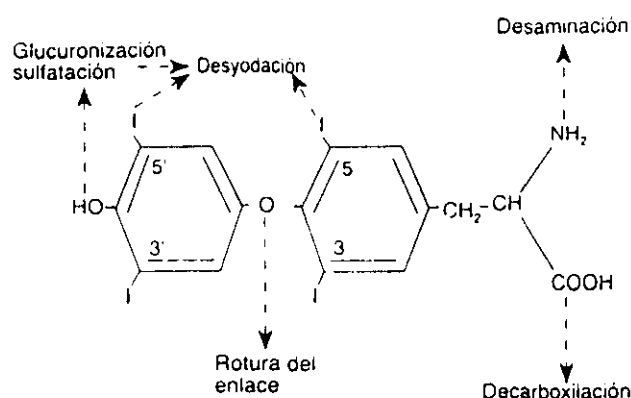


evidencias que apuntan a la existencia de un **proceso activo** mediado por sistemas transportadores específicos localizados en la membrana plasmática de las células (ver Visser, 1988; Docter y Krenning, 1990). Otros estudios sugieren que el transporte de HT a través de la membrana es  $\text{Na}^+$ - y ATP-dependiente. Por otra parte, se ha observado en varios tejidos que la captación de  $\text{T}_3$  parece ser  $\text{Na}^+$ -independiente, lo que indicaría la existencia de un transporte mediado más que activo (Zhou *et al.*, 1992). En adultos de *R. catesbeiana* se ha descrito la entrada de  $\text{T}_3$  en los eritrocitos mediante la unión inicial a receptores específicos de la membrana plasmática y a través de un mecanismo de endocitosis mediada por receptor, habiéndose identificado dos tipos de sitios de unión para  $\text{T}_3$ , uno de alta afinidad-baja capacidad y otro de baja afinidad-alta capacidad (Yamauchi *et al.*, 1989). La  $\text{T}_3$  es un inhibidor competitivo del transporte de  $\text{T}_4$  y viceversa, luego parece lógico pensar que el sistema transportador sea diferente para las dos hormonas. Por último, parece que existe un mecanismo de cotransporte de  $\text{T}_3$  y aminoácidos aromáticos por el que la  $\text{T}_3$  sería bombeada en contra de gradiente sin gasto de ATP (Zhou *et al.*, 1992).

### 2.3. Metabolismo de hormonas tiroideas.

Está aceptado que la actividad de las HT está determinada predominantemente por la concentración intracelular de  $\text{T}_3$  libre en los tejidos. De modo que, la biodisponibilidad de  $\text{T}_3$  depende de varios factores: a) la secreción tiroidea de  $\text{T}_3$  y  $\text{T}_4$ , b) la conversión extratiroidea de  $\text{T}_4$  a  $\text{T}_3$ , c) la degradación metabólica de  $\text{T}_3$  y d) el intercambio de  $\text{T}_4$  y  $\text{T}_3$  entre el plasma y los tejidos.

Las HT están sometidas a cuatro tipos de reacciones metabólicas (Ilustr. 6): 1) desyodación, que es la ruta más importante, no sólo cuantitativamente sino también por ser capaz tanto de activar como de desactivar la hormona, 2) conjugación del grupo hidroxilo fenólico con un doble propósito: la sulfatación facilita la posterior desyodación, sobre todo de  $\text{T}_3$ , en el hígado y la glucuronización es el primer paso en el ciclo enterohepático de  $\text{T}_4$  y  $\text{T}_3$ , 3) estos últimos compuestos se metabolizan también por desaminación oxidativa de la cadena lateral de alanina dando lugar a los correspondientes ácidos yodotiroacéticos, 4) finalmente, las yodotironinas pueden ser degradadas por ruptura del enlace éter (Visser, 1988).



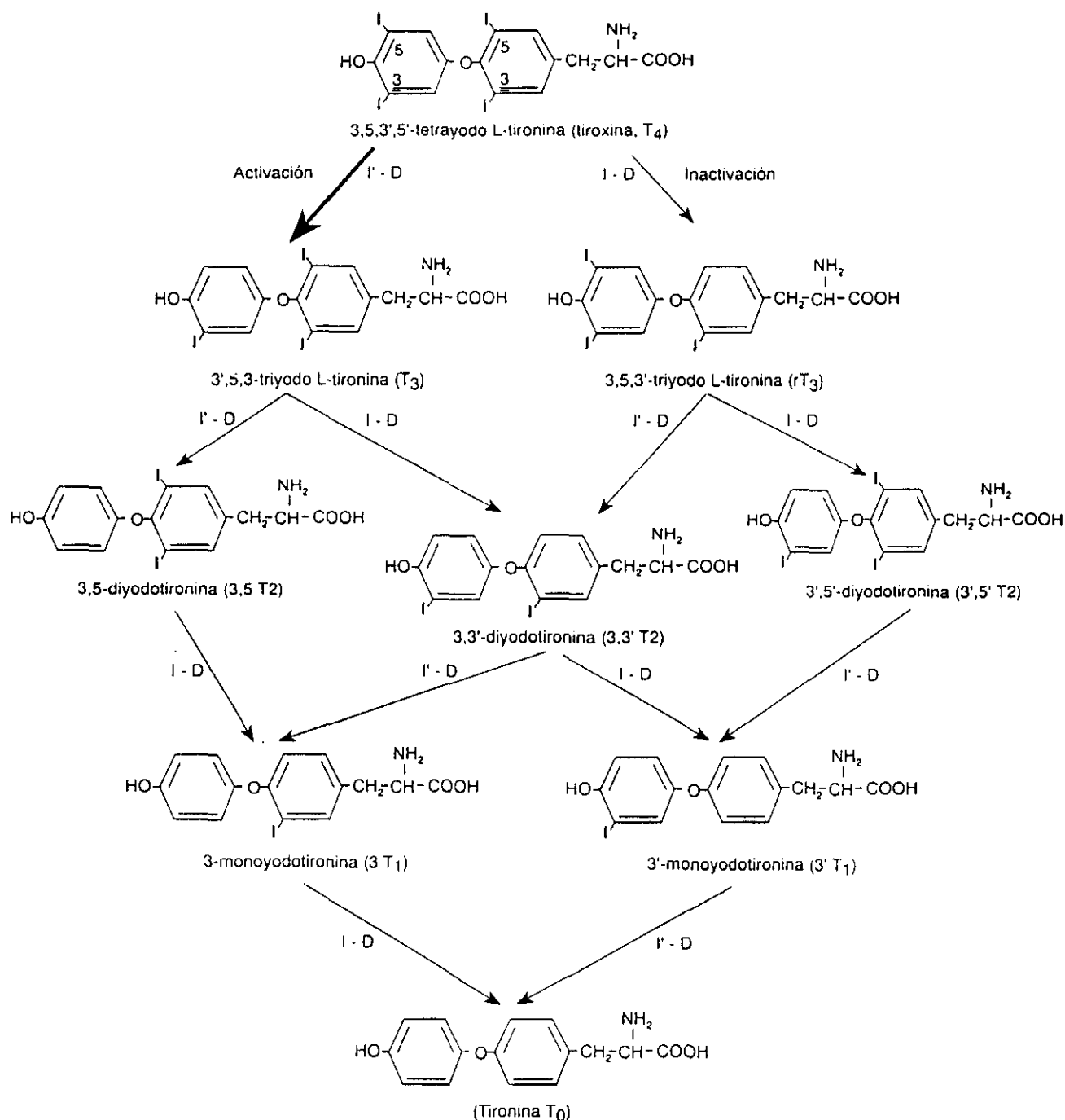
**Ilustr. 6.** Principales vías de metabolización de la tiroxina (Escobar *et al.*, 1992).

### 2.3.1. DESYODACIÓN.

En los homeotermos, la mayor parte de  $T_3$  y  $rT_3$  circulantes proceden de la conversión periférica de  $T_4$  (Kühn *et al.*, 1984a; Schoenmakers *et al.*, 1992), aunque la contribución tiroidea de  $T_3$  también puede ser importante en los cambios plasmáticos observados (Peeters *et al.*, 1992). En los animales poiquilotermos, la situación parece ser similar (Eales, 1990). Concretamente, en los anfibios anuros, se ha observado que la proporción  $T_3/T_4$  tiroidea es mucho menor que la observada en plasma indicando que prácticamente toda la  $T_3$  circulante procede de monodesyodación periférica (Leloup *et al.*, 1981; Kühn *et al.*, 1983; Kühn *et al.*, 1985).

La  $T_3$  se forma por monodesyodación del anillo fenólico de  $T_4$ , este proceso se conoce con el nombre de **5'-desyodación (5'D)** o desyodación del anillo externo. La  $rT_3$  se genera por monodesyodación del anillo tirosilo de la  $T_4$ , también denominada **5-desyodación (5D)** o desyodación del anillo interno (Ilustr. 7). Otro metabolito producido en la desyodación de hormonas tiroideas es la  $T_2$ , que se puede formar por 5D de  $T_3$ , siendo ésta una de las múltiples rutas metabólicas de  $T_3$ , o por 5'D de  $rT_3$ , que constituye el principal mecanismo de degradación de la misma.

Las desyodaciones 5'D y 5D son procesos diferentes, tanto química como fisiológicamente. Los átomos de yodo del anillo externo son fácilmente separados por reacciones de sustitución electrofílica, debido a la proximidad del grupo hidroxilo, contrastando con los enlaces estables de los átomos de yodo del anillo interno. Con relación a las implicaciones biológicas, la 5'D se considera como un paso de activación, ya que transforma la  $T_4$  en  $T_3$ , que es la hormona clásicamente considerada activa, mientras que la



**Ilustr. 7.** Cascada de desyodación de la tiroxina hasta la formación de tironina exenta de yodo (tomado de Escobar *et al.*, 1992). I'D=5'D; ID=5D.

5D es una reacción catabólica que, no sólo inactiva la  $T_3$ , si no que además evita su formación a partir de  $T_4$ .

En mamíferos, se reconoce la existencia de al menos tres enzimas desyodasas diferentes, denominadas desyodasa de tipo I, II y III (Berry y Larsen, 1992), que tienen en común su localización en las membranas tisulares y que son estimuladas por compuestos sulfhidrilo (SH), especialmente los ditioles (Leonard y Visser, 1986). Sin embargo, existen importantes diferencias (Tabla ii) entre las especificidades y mecanismos catalíticos de estas enzimas, así como en la distribución en los tejidos, la sensibilidad a inhibidores como el propiltiouracilo (PTU) y la regulación ejercida por las HT (Safran y Leonard, 1991; Safran *et al.*, 1991).

**Tabla ii.** Principales características diferenciadoras de las tres desyodasas de mamíferos (tomado de Escobar *et al.*, 1992).

	Tipo I	Tipo II	Tipo III
Desyodación en el:	anillo fenólico ( $\beta$ ) e interno ( $\alpha$ )	anillo fenólico ( $\beta$ )	anillo interno ( $\alpha$ )
Preferencia por sustrato	$rT_3 \gg T_4 \gg T_3$	$T_4 \geq rT_3$	$T_3 > T_4$
$K_m$ para $T_4$	1 $\mu M$ (1-5 mM DTT) #	1 nM (20 mM DTT)	40 nM (50 mM DTT)
Inhibidores:			
ácido iopanoico	↓	↓	↓
propiltiouracilo	↓	=	=
Localización tisular	hígado, riñón, tiroides, pulmón, etc.	SNC, adenohipófisis, tejido graso marrón	SNC, placenta, retina
Hipotiroidismo	↓ en hígado y riñón	↑ en SNC	↓ en SNC
Hipertiroidismo	↓ en hígado y riñón	↑ en SNC	↓ en SNC
Ayuno	↓ en hígado y riñón	↑ en SNC	↓ en SNC

# DTT: ditioneitol, cofactor usado in vitro.

En los poiquiloterms, las propiedades y localización tisular de la actividad desyodasa varía según las especies, observándose en la fracción microsomal de diversos tejidos (Eales, 1990).

En algunos teleosteos, más del 65% de la  $T_4$  circulante puede convertirse en  $T_3$  (anguila: De Luze y Leloup, 1984; salmónidos: Eales, 1985), y, al menos en las condiciones fisiológicas estudiadas hasta el momento, parece ser que la ruta principal de desyodación de  $T_4$  implica una actividad 5'D, presente principalmente en hígado, para dar lugar a la formación de  $T_3$ , ya que no se detectan ni  $rT_3$  ni  $T_2$  (Eales *et al.*, 1983; Sweeting y Eales, 1992a). Sin embargo, bajo condiciones experimentales en las que se administra un exceso de  $T_3$ , se ha observado la presencia de  $rT_3$  (Sweeting y Eales, 1992b). Por otra parte, la desyodación de yodotironinas en peces podría diferir de la observada en mamíferos, puesto que se observan diferencias importantes entre la 5'D hepática de trucha y las desyodasas tipo

I y II de mamíferos (MacLatchy y Eales, 1992a; Sweeting y Eales, 1992b). En otros teleósteos (*Oreochromis niloticus*) se ha descrito la presencia tanto de una actividad 5D como 5'D, siendo más abundante la actividad 5'D en riñón que en hígado, en contraste con los estudios anteriormente citados (Byamungu *et al.*, 1992) y se ha observado un aumento en  $rT_3$  tras la estimulación de la liberación de  $T_4$  por varias hormonas hipofisarias (Byamungu *et al.*, 1990). Recientemente, se ha observado que las enzimas 5'D presentes en hígado y riñón de esta especie son diferentes, de modo que la presente en riñón sería equivalente a la desyodasa tipo I de mamíferos, mientras que la de hígado sería análoga a la tipo II (Mol *et al.*, 1993). También se ha descrito la existencia de estas dos actividades enzimáticas (5D y 5'D) en varios tejidos de otro teleósteo (*Salmo salar*), observándose cambios de la 5'D en hígado (correlacionados con los niveles plasmáticos de  $T_3$ ), corazón y cerebro durante la muda inducida por fotoperíodo largo, así como cambios en la actividad 5D en hígado y cerebro que podrían estar reflejando una autorregulación del metabolismo intracelular de las HT (Morin *et al.*, 1993).

Los escasos estudios realizados en reptiles parecen indicar que la actividad 5'D es parecida a la de tipo I de mamíferos (Wong *et al.*, 1993).

Estudios pioneros llevados a cabo por el Profesor Tata (1960) pusieron de manifiesto la desyodación de  $T_4$  en anfibios, detectada en homogeneizados de hígado y músculo. Posteriormente, se describió la existencia de un mecanismo de desyodación de  $T_4$  en el hígado de larvas, pero no de adultos, de *R. pipiens* (Galton e Ingbar, 1962). Asimismo, Robinson (1977) indicó la existencia de un sistema de desyodación en hígado y cola durante la metamorfosis de *X. laevis*. Sin embargo, en todos estos estudios no parece tratarse de una reacción de monodesyodación, si no de una desyodación general que podría estar catalizada por una peroxidasa (Robinson, 1977).

Debido a la gran importancia de las HT en la metamorfosis de anfibios anuros, se han realizado bastantes estudios sobre la desyodación durante el desarrollo. Se ha determinado que esta conversión periférica es esencial para el proceso metamórfico, ya que su inhibición *in vivo* con ácido iopanoico (IOP) retrasa el desarrollo, lo que ha llevado a proponer que, a pesar de que la  $T_4$  es la HT circulante mayoritaria, la principal hormona metamórfica es la  $T_3$  (Buscaglia *et al.*, 1985). Parece que el aumento de  $T_3$  plasmática observado durante el clímax sería fundamentalmente un reflejo de un incremento en la desyodación periférica, ya que la proporción  $T_3/T_4$  tiroidea es muy pequeña (Suzuki y Suzuki, 1981: *R. catesbeiana*; Schulteiss, 1980: *X. laevis* y *R. esculenta*). Además, también se ha observado que el máximo

de actividad 5'D detectable desde el final de la premetamorfosis en *X. laevis*, coincide con el máximo de  $T_3$  plasmática hacia la mitad del clímax (Buscaglia *et al.*, 1985).

En larvas de *R. catesbeiana* la conversión *in vivo* de  $T_4$  a  $T_3$  no se produce prácticamente hasta el final de la prometamorfosis, pero la actividad 5'D está presente durante y después del clímax metamórfico (Galton y Munck, 1981). Estudios *in vitro* en larvas premetamórficas de la misma especie revelaron además la ausencia de actividad 5'D en tejidos de la cola, hígado, corazón y riñón, una cantidad prácticamente no detectable en cerebro e intestino y sólo pudo ser cuantificada en piel (Galton, 1988a). Durante el clímax la conversión de  $T_4$  a  $T_3$  aumenta hasta cinco veces en piel e intestino y cuando comienza la reabsorción de la cola este tejido adquiere la actividad 5'D, que sigue sin detectarse en hígado, riñón y corazón (Galton y Hiebert, 1988). Las propiedades de esta actividad 5'D son similares a las de la enzima tipo II de mamíferos (Kühn *et al.*, 1993b). Por otra parte, la actividad 5D, que desactiva la  $T_4$  convirtiéndola en  $rT_3$ , está presente en microsomas hepáticos de larvas pre- y prometamórficas de *R. catesbeiana* y disminuye hasta hacerse prácticamente no detectable en todos los tejidos hacia los estados finales del clímax metamórfico (Galton y Hiebert, 1987b). Las características cinéticas de la enzima y la inhibición de su actividad por análogos de la  $T_4$  pero no por PTU, son similares a las de la desyodasa de tipo III de mamíferos (Leonard y Visser, 1986) y al sistema 5D presente en el hígado del embrión de pollo (Galton y Hiebert, 1987a; Kühn *et al.*, 1993a).

Los cambios de 5D a 5'D que se producen durante el clímax de anfibios anuros, son similares a los observados durante el período perinatal de mamíferos y aves (revisado por Kühn *et al.*, 1993b). Sin embargo, la distribución y las características de las desyodasas durante el desarrollo de anfibios muestran una serie de diferencias con respecto al patrón mamífero (McNabb y Freeman, 1990).

En *A. mexicanum*, la actividad 5'D es muy baja durante todo el desarrollo y parece no existir la actividad 5D, tanto en individuos juveniles como adultos (Galton, 1992).

En cuanto a los anfibios adultos (anuros y urodelos), aunque se han realizado muchos menos estudios, también se ha demostrado la existencia de una actividad 5'D en *R. catesbeiana*, *Necturus maculosus* (Galton, 1985), *X. laevis* (Buscaglia *et al.*, 1985), *Bufo marinus* (Sawin *et al.*, 1981a), *Rana ridibunda* y *Dicroglossus occipitalis* (Vandorpe *et al.*, 1987; Vandorpe *et al.*, 1990). En *R. ridibunda* y *D. occipitalis*, se ha demostrado que esta actividad es mucho más importante en homogeneizados de riñón y piel que en hígado (Vandorpe *et al.*, 1987; Vandorpe *et al.*, 1990; Jacobs y Kühn, 1990) y parece similar a la

5'D tipo II de mamíferos (Kühn *et al.*, 1993b). También se ha detectado la presencia de una actividad 5D análoga a la de tipo III de mamíferos en varios tejidos de individuos adultos de *R. catesbeiana* (véase Kühn *et al.*, 1993b).

### 2.3.2. CONJUGACIÓN.

La conjugación es una reacción que transforma compuestos lipofílicos endógenos y exógenos en derivados solubles en agua para facilitar su excreción en la bilis y la orina (Dutton, 1980). El estudio de estos procesos de degradación de las HT se ha llevado a cabo fundamentalmente en mamíferos.

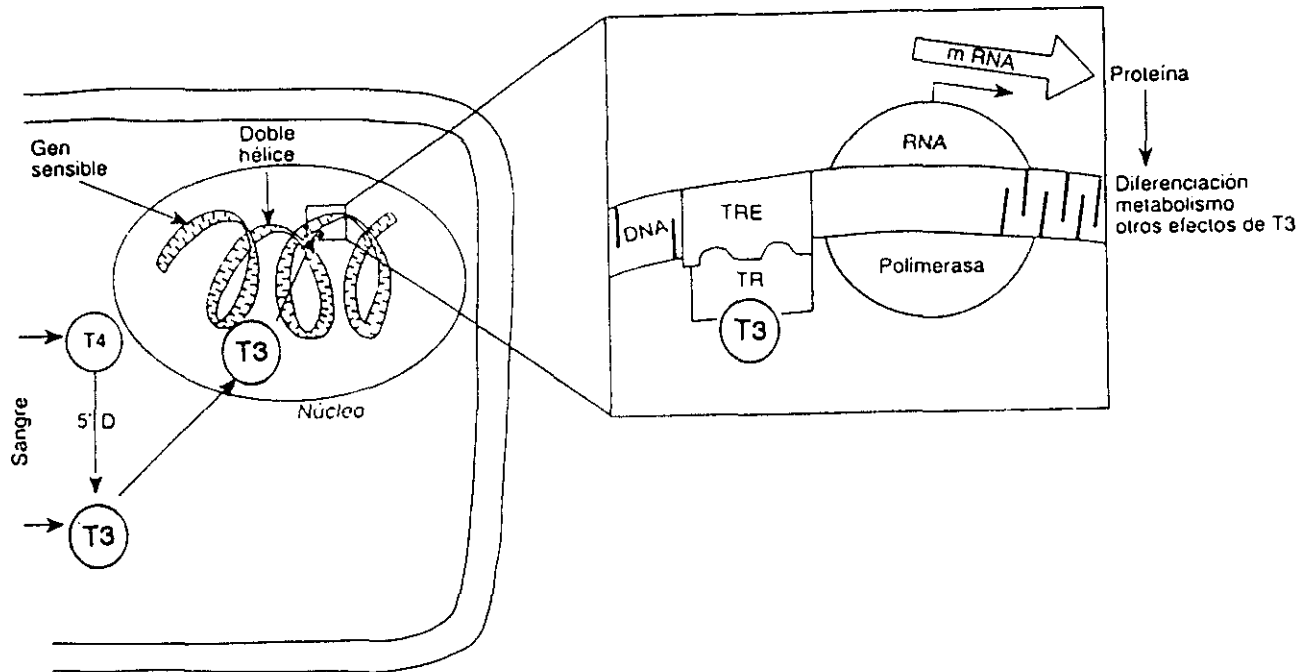
La **glucuronización** es catalizada por un grupo de enzimas localizadas en el retículo endoplásmico del hígado y otros tejidos. Por otra parte, los derivados glucuronados de las HT también pueden sufrir desconjugación, por la acción de  $\beta$ -glucuronidasas, y 5'-desyodación como ruta alternativa de producción de  $T_3$  (Hays y Cavalieri, 1992).

También se han identificado diferentes fenol sulfotransferasas que catalizan la **sulfatación** de las HT en la fracción soluble de hígado especialmente. De forma similar a lo que ocurre en el caso de la glucuronización, los derivados sulfatados de  $T_3$  pueden sufrir desulfatación y desyodación en hígado y cerebro de fetos y adultos de rata (Santini *et al.*, 1992), y parece ser que dichos derivados serían una fuente local de  $T_3$  en determinados tejidos en situaciones críticas.

En larvas de anuros el órgano principalmente implicado en la degradación de las HT es el hígado. También el intestino acumula selectivamente HT, aunque más lentamente. La mayoría de la  $T_3$  es rápidamente conjugada en el hígado por sulfatación o glucuronización y excretada en la bilis y en las heces. La conjugación de  $T_4$  es mucho más lenta y parece que requiere una transformación molecular previa. No se han encontrado evidencias de reabsorción intestinal de  $T_3$ , aunque sí de  $T_4$  (véase Dodd y Dodd, 1976).

## 2.4. Modo de acción de las hormonas tiroideas: Receptores.

Los múltiples efectos biológicos de las HT resultan de la unión con receptores nucleares, lo que provoca un aumento de la transcripción (Ilustr. 8), formación de nuevos ARNm y síntesis de proteínas específicas que son finalmente las responsables de la expresión de la acción de las HT al nivel celular (Oppenheimer *et al.*, 1987). Sin embargo, también se ha sugerido que la acción de las HT en anfibios pueden no estar mediadas exclusivamente a nivel nuclear (Sidlowski y Frieden, 1982).



**Ilustr. 8.** Representación esquemática del mecanismo de acción de las hormonas tiroideas a través del receptor nuclear (tomado de Escobar *et al.*, 1992). TR, receptor nuclear de hormonas tiroideas; TRE, gen sensible a hormonas tiroideas.

En pocos años se ha demostrado que no hay un único receptor nuclear de HT, de manera que, incluso para una misma especie, se encuentran múltiples ARNm que codifican proteínas diferentes que cumplen los criterios para ser consideradas receptores de HT. Estas proteínas se han clasificado en formas  $\alpha$  y  $\beta$ , dependiendo de las similitudes entre las secuencias aminoacídicas y la localización cromosómica (Escobar *et al.*, 1992). La secuencia de aminoácidos de la proteína producto del proto-oncogén *c-erb-A* (homólogo celular de la región A del gen del virus de la eritroblastosis aviar) presenta grandes analogías con los receptores nucleares de HT, esteroides, ácido retinoico y vitamina D, por lo que en la actualidad se habla de la superfamilia de receptores de HT y esteroides (Escobar *et al.*, 1992; Maksymowych *et al.*, 1993).

Se han caracterizado parcialmente lugares de unión de  $T_3$  de alta afinidad ( $K_d$   $10^{-10}M$ ) y baja capacidad ( $\leq 1.000$  sitios/célula), características típicas de los receptores hormonales, en el núcleo de células hepáticas y de otros tejidos de peces (ciclóstomos: Lintlop y Youson, 1983; teleósteos salmónidos: Darling *et al.*, 1982; Sullivan *et al.*, 1987; Bres y Eales, 1988) y reptiles (Wong y Chiu, 1987). Estos sitios de unión nucleares presentan un tamaño molecular, una  $K_d$  y una especificidad análoga a los receptores intranucleares de



homeotermos (Gagnon *et al.*, 1992), lo que indica su conservación en la evolución (Eales, 1990).

En los anfibios, se ha estudiado la existencia de receptores de HT fundamentalmente en larvas encontrándose que las características de los sitios de unión nuclear de  $T_3$  son generalmente las mismas que las observadas en otros vertebrados. Así, se ha observado en larvas de *R. catesbeiana* que  $T_3$  y  $T_4$  se unen al mismo receptor, siendo mayor la afinidad de para  $T_3$  que para  $T_4$  (Galton, 1986), a pesar de que con anterioridad (Galton, 1980a), deficiencias técnicas llevaron a proponer la existencia de un receptor específico para  $T_4$  en larvas premetamórficas.

Estudios pioneros demostraron que existen receptores nucleares de HT en células aisladas de la aleta caudal (Yoshizato y Frieden, 1975; Yoshizato *et al.*, 1975; Suzuki y Kikuyama, 1983) y del hígado (Kistler *et al.*, 1975) de larvas premetamórficas de *R. catesbeiana*. Posteriormente, también fueron detectados en células hepáticas por otros autores (*in vivo*: Toth y Tabacknick, 1979; Galton, 1980a; en núcleos aislados: Galton y Schaafsma, 1983), y se han detectado receptores putativos de HT en el núcleo de eritrocitos larvarios (Moriya *et al.*, 1984; Galton, 1984). Recientemente, se han aportado nuevos datos que apoyan la designación de los sitios de unión de  $T_3$  como verdaderos receptores (Thomas *et al.*, 1992). El número de receptores en el tejido caudal y en eritrocitos, pero no en hepatocitos, aumenta durante el desarrollo en *R. catesbeiana*. Una explicación para este hecho sería que, tanto en la cola como en eritrocitos, la metamorfosis dependiente de HT provoca una rápida muerte celular, mientras que en el caso del hígado se produce una diferenciación bioquímica de las células para adquirir la funcionalidad adulta (Galton, 1988b). Por otra parte, según progresa el clímax, el número de receptores disminuye en eritrocitos alcanzando valores similares a los del adulto, probablemente debido al reemplazamiento de los eritrocitos larvarios por eritrocitos adultos, que poseen muchos menos sitios de unión por núcleo (Galton y St. Germain, 1985).

El hecho de que, en larvas de *R. catesbeiana*, los receptores tengan más afinidad por  $T_3$  que por  $T_4$ , junto con la alta ocupación nuclear de la  $T_3$  durante el clímax metamórfico ponen de manifiesto una vez más la importancia de esta hormona durante el desarrollo de anuros (Galton, 1988b). Sin embargo, algunos tejidos larvarios responden más a  $T_4$  que a  $T_3$  (Kollros, 1961) y ciertas respuestas fisiológicas ocurren sólo con  $T_4$  en anfibios adultos (Dupré *et al.*, 1986), aves (Chandola y Bhatt, 1982) y mamíferos (Erfurth y Hedner, 1987; Halperin *et al.*, 1991).

También se han descrito sitios de unión específicos de  $T_3$  en hígado (Galton, 1980c; Galton *et al.*, 1982) y eritrocitos (Galton, 1985) de individuos adultos de *Rana pipiens* y *R. catesbeiana*. Sin embargo, el número de receptores de HT en adultos es mucho menor que en larvas. Así, en adultos de *R. catesbeiana*, el número de receptores en núcleos de eritrocitos es de  $90 \pm 26$ , comparado con los casi 2.500 sitios/núcleo del estado XIX TK, presentando una  $K_d$  de  $1,0 \pm 0,23 \times 10^{-11}$  M, también inferior a la encontrada en el estado XIX TK ( $2,3 \pm 0,70 \times 10^{-11}$  M) (Galton, 1988b). Una situación comparable se ha descrito en *A. mexicanum*, de modo que el número de receptores de HT nucleares, sobre todo de eritrocitos, es mucho mayor en individuos juveniles que en adultos (Galton, 1992). Los núcleos hepáticos de individuos adultos presentan dos tipos de receptores para  $T_3$ , pero también en menor número que en larvas (Galton, 1980c).

### 3. EFECTOS DE LAS HORMONAS TIROIDEAS EN ANFIBIOS ANUROS.

Las HT son únicas entre el grupo de moléculas responsables del éxito de los vertebrados. En la evolución de los vertebrados, estas hormonas han asumido un papel doble en la iniciación del desarrollo y la regulación del metabolismo (Frieden, 1981).

En todos los vertebrados estudiados, se ha demostrado que las HT desempeñan un papel crucial en el desarrollo y maduración del cerebro (véase Grave, 1977). En los homeotermos, las HT están implicadas en el crecimiento (Ikeda *et al.*, 1991; Cacicedo *et al.*, 1993, Denver y Harvey, 1991), metabolismo (Salleh *et al.*, 1993; Betley *et al.*, 1993), reproducción (Klandorf *et al.*, 1992; Goldman *et al.*, 1993) y termogénesis (Frieden, 1981; Dauncey, 1990). En aves también participan en la muda y migración (Wentworth y Ringer, 1986). En cuanto a los poiquilotermos, el tiroides ejerce su influencia sobre el crecimiento, el desarrollo, la migración, la muda, la transición del medio acuático al terrestre y la reproducción (véase Dickhoff y Darling, 1983).

En reptiles expuestos a altas temperaturas la administración farmacológica de HT estimula la tasa metabólica estándar (John-Alder, 1983) y las enzimas del metabolismo intermediario (Oommen y Sreedeviama, 1988), facilitando la transferencia de metabolitos en el metabolismo oxidativo activado (Jacob y Oommen, 1990). Sin embargo, los cambios estacionales de la tasa metabólica estándar y de HT plasmáticas no están bien correlacionados (John-Alder, 1984). Recientemente se ha constatado que el incremento de los niveles

plasmáticos de  $T_4$  dentro del rango fisiológico produce un aumento de la tasa metabólica estándar y de la tasa metabólica diaria total en animales libres, pero no en los cautivos (John-Alder, 1990; Joos y John-Alder, 1990), y se ha sugerido que la  $T_4$  podría estar facilitando la actividad locomotora, aunque no produce un aumento de los niveles de actividad total (Joos y John-Alder, 1990). Por otra parte, en tortugas (*Pseudemys scripta elegans*) se ha observado que, si bien el estado tiroideo puede afectar al crecimiento y metabolismo de individuos juveniles, no se puede descartar un efecto secundario del tipo de dieta y de la cantidad de ingesta (Stamper *et al.*, 1990).

En teleósteos, la administración crónica de dosis fisiológicas de HT, sobre todo de  $T_3$ , facilitan el crecimiento, respuesta en la que contribuyen un aumento del apetito y de la eficacia en la conversión de la comida (Higgs *et al.*, 1982). En cuanto a la maduración gonadal, parece aceptado que las HT desempeñan un papel en la maduración ovárica (Leatherland, 1987; Weber *et al.*, 1992) y se ha observado que la  $T_4$  aumenta la incorporación *in vitro* de vitelogenina en ovocitos de trucha (Shibata *et al.*, 1993). Además, parece que las HT facilitan la acción de otras hormonas en la migración y muda de los salmónidos (Dickhoff y Sullivan, 1987), y se ha descrito una asincronía entre los cambios de HT en plasma y en tejidos durante este proceso (Specker *et al.*, 1992), indicando la importancia de la regulación periférica del eje tiroideo. Por otra parte, se ha demostrado que la  $T_3$  es necesaria en la adaptación al agua marina (Lebel y Leloup, 1992). Por último, la presencia de HT en huevos de teleósteos (Tagawa y Hirano, 1987; Weber *et al.*, 1992) sugiere que podrían tener un papel antes de la eclosión, y se ha demostrado su importancia en la metamorfosis de algunas especies (Tagawa *et al.*, 1990; Okimoto *et al.*, 1993).

### 3.1. Larvas.

Debido a que las HT son la clave de la metamorfosis de anfibios, sus efectos sobre los distintos tejidos y funciones fisiológicas a lo largo de este proceso son múltiples (Tabla iii).

La mayoría de los tejidos larvarios adquieren la capacidad de responder a HT muy pronto en el desarrollo, de manera que aparentemente las HT podrían tener efectos metabólicos y de maduración previos a la metamorfosis dependiente de HT. Además, parece que la glándula tiroidea sintetiza hormona desde el principio de la vida larvaria (Hanaoka *et al.*, 1973) aunque no se conoce muy bien su función durante este período, salvo la participación en la maduración del cerebro (véase Gorbman, 1964) y cerebelo que es

**Tabla iii.** Principales cambios morfológicos y funcionales inducidos por las HT durante la metamorfosis de anfibios\*.

<b>Piel</b>	
Formación de las glándulas dérmicas	Crecimiento del cerebelo
Degeneración de la piel de la cola	Crecimiento de las células de la columna motora lateral
Proliferación de la piel de las extremidades	Crecimiento del núcleo hipotalámico preóptico
Formación de la ventana de piel para las patas delanteras (anuros)	Desarrollo del sistema porta hipofisario y de la eminencia media
Degeneración del opérculo	Incremento de la rodopsina retinal
Formación de la membrana nictitante	Fusión de las retinas interna y externa
Diferenciación de las células de Leydig	Crecimiento de los ganglios de la raíz dorsal
Transporte de sodio (¿indirecto?)	Degeneración de las células de Rohon-Beard
Cambios en los pigmentos de la piel y los patrones de pigmentación	
<b>Tejidos de soporte y conectivo</b>	<b>Riñón</b>
Degeneración de la cola (anuros)	Reabsorción del pronefros
Degeneración de los arcos branquiales	Inducción de los receptores de prolactina
Reestructuración de la boca y la cabeza	
Calcificación del esqueleto	<b>Sistema respiratorio</b>
	Regresión de las branquias
<b>Músculo</b>	<b>Tracto gastrointestinal y estructuras asociadas</b>
Degeneración del músculo caudal (anuros)	Regresión y reorganización del tracto intestinal
Crecimiento de los músculos de las extremidades	Reducción y reestructuración del páncreas
Crecimiento de los músculos extrínsecos del ojo	Inducción del ciclo de la urea y otras enzimas hepáticas
<b>Sistema nervioso y sensorial</b>	
Reducción de las células de Mauthner	
Crecimiento del núcleo mesencefálico V	

\* Adaptado de White y Nicoll (1981)

dependiente de hormonas tiroideas (Gona, 1977). Más recientemente, se han descrito efectos premetamórficos de las HT sobre los ganglios sensoriales de larvas de *R. catesbeiana*, sugiriéndose que la respuesta de las neuronas sensoriales lumbares y caudales a las HT son paralelas a las de sus tejidos diana periféricos (Ando y Hammerschlag, 1989). La influencia del sistema nervioso central sobre la función tiroidea es probablemente nula durante la premetamorfosis (Rosenkilde, 1985). Por otra parte, es importante señalar que parece que la parte del hipotálamo que posteriormente dará lugar a la eminencia media, de importancia vital en la conexión del eje tiroideo, no responde a HT hasta el final de la premetamorfosis (véase Dodd y Dodd, 1976).

La sensibilidad de los tejidos a las HT cambia a lo largo del desarrollo, de modo que células que en un principio no respondían a  $T_4$  pueden adquirir gradual o súbitamente la capacidad de respuesta a esta hormona. Estos cambios desempeñan evidentemente un papel importante en la capacidad de un tejido para completar la metamorfosis (Duellman y Trueb, 1986). Los tejidos que primero responden a la administración exógena de  $T_4$  son normalmente estructuras larvarias transitorias. No todos los tejidos sufren el mismo tipo de cambios en respuesta a los niveles crecientes de HT que se producen durante la metamorfosis. Así, algunos órganos, como las extremidades y los pulmones, crecen; otros, como la cola y las branquias, degeneran; y por último, hay órganos, como el hígado, que sufren únicamente cambios funcionales (Burggren y Just, 1992). La razón por la que los diferentes tejidos responden de forma distinta a las HT y en momentos distintos no está clara, pero quizás la explicación podría estar en la unión selectiva de  $T_3$  y  $T_4$  a los receptores intracelulares.

La reabsorción de la cola es uno de los sucesos más espectaculares de la metamorfosis de anuros. La sensibilidad de los tejidos caudales a las HT aparece gradualmente durante el curso del desarrollo larvario y se ha demostrado, como hemos citado anteriormente, un aumento en el número de RT en este tejido durante la metamorfosis (Yoshizato y Frieden, 1975), así como un aumento en la transcripción génica en el tejido muscular caudal inducido por  $T_3$  (De Luze *et al.*, 1993), aunque también se ha observado la existencia de un pequeño número de genes cuya transcripción es regulada de forma negativa por las HT (Kanamori y Brown, 1993). Por otra parte, la cola de las larvas está compuesta por diversos tejidos que incluyen epidermis, tejido conectivo mesenquimático y músculo. Estudios *in vitro* han revelado que el tejido epidérmico produce alguna sustancia necesaria para que se produzca la regresión caudal inducida por  $T_3$  en larvas de *R. catesbeiana*; de modo que el tejido caudal

carente de epidermis no regresa en presencia de  $T_3$  (Niki *et al.*, 1982), pero sí lo hace si se le añade medio procedente del cultivo de piel en presencia de  $T_3$  (Niki *et al.*, 1984). Parece que en la respuesta de la aleta caudal a  $T_3$  en larvas premetamórficas de *R. catesbeiana* está implicado el GMPc (Sidlowski y Frieden, 1982).

El principal cambio metamórfico del **hígado** es el giro en el conjunto de proteínas específicas sintetizadas por las células hepáticas. En este sentido, las proteínas larvarias tienden a desaparecer antes de que las proteínas postmetamórficas aparezcan. Los cambios en el patrón de síntesis proteica están sincronizados con el patrón global de sucesos metamórficos. La aparición de la síntesis de urea es parte de los cambios químicos y morfológicos que se producen durante la metamorfosis espontánea y se ha descrito una regulación positiva de los ARNm de enzimas del ciclo de la urea ejercida por HT en larvas de *R. catesbeiana* (Helbing *et al.*, 1992). Sin embargo, la síntesis de urea también se desarrolla en el ajolote neoténico, de forma que, aunque este proceso puede ser dependiente de HT, los niveles necesarios para provocar esta respuesta no serían lo suficientemente altos como para inducir cambios morfológicos (véase Rosenkilde, 1985). También se ha observado que las HT ejercen una compleja regulación transcripcional y post-transcripcional del gen de la L-arginasa hepática durante el desarrollo postembrionario de *X. laevis* (Xu *et al.*, 1993). En hígado de larvas premetamórficas de *R. catesbeiana* se ha detectado un incremento de los niveles de GMPc (Sidlowski y Frieden, 1982) y del ARNm de la albúmina (Averyhart-Fullard y Jaffe, 1990) tras el tratamiento con  $T_3$ .

El **intestino delgado** de los anuros cambia notablemente del estado larvario al adulto en un corto período de tiempo durante la metamorfosis espontánea. Al principio del clímax, las células epiteliales larvarias empiezan a experimentar un proceso de muerte celular, mientras que las adultas proliferan rápidamente y se diferencian. Se ha demostrado que, si bien  $T_3$  induce la muerte celular *in vitro*, otras hormonas, como cortisol e insulina, son necesarias para la proliferación y diferenciación del epitelio adulto (Ishizuya-Oka y Shimozawa, 1991). También se ha observado recientemente que, al igual que ocurre en el tejido caudal y en las extremidades, muy pocos genes son regulados negativamente por HT a lo largo del desarrollo, y la mayoría de los genes regulados positivamente son genes tempranos, expresándose algunos en otros tejidos además del intestinal (Shi y Brown, 1993).

En anfibios, la epidermis juega un papel crucial en la **osmorregulación**, cuyo componente principal es la bomba de sodio (ATPasa  $Na^+K^+$ ). Tanto en anuros como en urodelos, se ha observado que las HT estimulan la actividad de la bomba de sodio epidérmica

y parece que inducen la formación de canales de sodio durante la metamorfosis (Takada y Hara, 1988; Burón y Navas, 1988). Se ha propuesto que esta estimulación se debería a un efecto post-traducción sobre la enzima ya sintetizada (Burón y Navas, 1988), y es posible que, concretamente, se produzca un grado de glucosilación diferente de la subunidad  $\beta$  de la ATPasa  $\text{Na}^+ - \text{K}^+$  (Villalba *et al.*, 1993).

Durante la metamorfosis, el **cráneo** cartilaginoso de las larvas se transforma mediante una combinación de procesos de reabsorción del cartílago existente y la proliferación del nuevo cartílago y la aparición del hueso, que predomina en el cráneo adulto. Se ha demostrado que estos cambios están mediados por HT en ambos tejidos (Hanken y Summers, 1988), aunque parece que la respuesta de cada uno de ellos a las HT es independiente, de manera que muchos de los cambios no están estrechamente acoplados durante el desarrollo (Hanken *et al.*, 1989).

La **vitelogenina**, que dará origen tras su procesamiento en el huevo a las proteínas vitelinas que constituyen la reserva nutritiva de vitelo, se sintetiza en el hígado bajo la estimulación ejercida fundamentalmente por los estrógenos (Wallace, 1985), si bien recientemente se ha descrito una acción estimuladora de varias hormonas hipofisarias sobre la síntesis y liberación de vitelogenina hepática *in vitro* en *R. esculenta* (Carnevali *et al.*, 1992, 1993). El hecho de que la inducibilidad de los genes de vitelogenina por estradiol ( $\text{E}_2$ ) se adquiriera durante la metamorfosis (Ng *et al.*, 1984) sugiere la implicación de las HT en este proceso. En este sentido, se ha demostrado que  $\text{T}_3$  induce de forma directa la transformación de hepatocitos inmaduros en células competentes capaces de sintetizar vitelogenina bajo estimulación estrogénica durante la metamorfosis de *X. laevis* (Kawahara *et al.*, 1989). Por otra parte, en individuos adultos de *Xenopus* la expresión del gen de la albúmina está regulada por estrógenos durante la respuesta vitelogénica (Riegel *et al.*, 1986). Posteriormente se ha demostrado que las HT están implicadas en la regulación de la expresión del gen de albúmina durante el desarrollo de *X. laevis*, de manera que la administración de  $\text{T}_3$  resulta en la inducción prematura del ARNm de la albúmina (Moskaitis *et al.*, 1989).

Parece que las HT pueden estar implicadas en la **termorregulación** en larvas de anfibios. La administración de  $\text{T}_4$  indujo un descenso en la temperatura modal seleccionada por larvas de *R. pipiens* (véase Hutchison y Dupré, 1992). En larvas de *X. laevis* se ha descrito la existencia de una correlación entre la actividad tiroidea y la tolerancia al frío y al calor. Así, según avanza la metamorfosis se produce un aumento en la tolerancia al frío

(Dainton, 1988) y un descenso en la tolerancia al calor (Dainton, 1991). La adición de  $T_4$  al agua en el que estaban inmersas las larvas resultaba en una notable reducción de la mortalidad, sugiriendo que la  $T_4$  puede conferir resistencia al frío en *X. laevis* (Dainton, 1988). Sin embargo, se ha observado un aumento en la temperatura media seleccionada por larvas de *R. catesbeiana* según avanza el desarrollo (Dupré *et al.*, 1986b).

Se han descrito **otros efectos** de las HT sobre la maduración de diversos sistemas. Así, el aumento de los niveles de prolactina (PRL) que se observa hacia el final del clímax se produce bajo la influencia estimuladora del hipotálamo, y el desarrollo de este sistema estimulador hipotalámico depende de HT (Kawamura *et al.*, 1986) y además el tratamiento con  $T_3$  aumenta la capacidad de unión de la PRL a sus receptores renales, aunque tiende a disminuir la afinidad en *A. tigrinum* (Bres y Nicoll, 1993). También se ha observado que las HT aceleran la diferenciación del pigmento visual ocular del tipo larvario al adulto en algunas especies (véase Duellman y Trueb, 1986; Hoskins, 1990) y parece ser que la  $T_4$  es necesaria para iniciar la pérdida de axones que se produce durante el desarrollo, regulando probablemente la producción de los mismos, como se ha observado en el nervio oculomotor de larvas de *X. laevis* (Schönenberger y Escher, 1988). La transición de hemoglobina larvaria a hemoglobina adulta también podría estar regulada por HT (Arai y Wakahara, 1993).

### 3.2. Adultos.

El tiroides, como hemos visto en el apartado anterior, desempeña papeles importantes durante el desarrollo de anfibios. Sin embargo, mucho menos conocida es la función de las HT en anfibios adultos, donde se ha observado que el tiroides es menos activo aunque capaz de sintetizar  $T_3$  y  $T_4$ , siendo los niveles de HT plasmáticas medidos en distintas especies de anfibios adultos enormemente variados (véase Stieff y Kaltenbach, 1986).

La presencia de  $T_4$  en el citoplasma y el núcleo de eritrocitos adultos de *R. pipiens*, *R. catesbeiana*, *B. marinus*, *X. laevis* y *Notophthalmus viridescens*, sugiere que las HT pueden tener cierta importancia fisiológica en anfibios adultos (Herman, 1992). Otro hecho que indica que las HT pueden desempeñar un papel importante en la fisiología de los anfibios adultos, es la existencia de cambios estacionales de la función tiroidea en anuros (Kühn *et al.*, 1985; Rosenkilde y Jørgensen, 1977; Tasaki *et al.*, 1986; Saad y Ali, 1992) y urodelos (Norris *et al.*, 1977).

El estudio del papel de las HT en anfibios adultos se limitó inicialmente a dos áreas: a) acciones sobre el metabolismo, y b) acciones sobre el tegumento.



La mayoría de los intentos de estimular el consumo de oxígeno en anfibios adultos mediante el tratamiento con HT no tuvieron éxito en un principio (Hutchison y Dupré, 1992), aunque algunos trabajos clásicos describían efectos estimuladores de  $T_3$  y  $T_4$  *in vivo* sobre el consumo de oxígeno en adultos de *Rana*, *Bufo* y *Triturus*. También se observó un aumento del consumo de oxígeno *in vitro* en riñón y corazón, pero no en músculo e hígado, de adultos de *Bufo paracnemis* y *Bufo arenarum* tras la inyección de altas dosis de HT (véase Gorbman, 1964). La explicación de esta disparidad de resultados viene dada probablemente por el hecho de que parece que existe un requerimiento térmico. En este sentido, Packard y Packard (1975) encontraron, en respuesta a inyecciones de  $T_4$ , un incremento del consumo de oxígeno del hígado de *Rana tigrina* aclimatadas a 25°C, pero no a 15°C, siendo estos datos confirmados posteriormente por Chiu y Tong (1979), que además encontraron que la  $T_4$  también disminuía el glucógeno hepático a 25°C. Posteriormente, se observaron en repetidas ocasiones efectos positivos de la  $T_4$  sobre el consumo de oxígeno, tanto *in vivo* como *in vitro*, en diversas especies de anfibios (véase Hutchison y Dupré, 1992), y recientemente, se ha descrito un efecto de la  $T_4$  estimulando la liberación basal de  $CO_2$  en *B. japonicus*, lo que reflejaría un aumento del **metabolismo** basal (Tasaki e Ishii, 1990b).

Tampoco hay muchas evidencias que apunten hacia la participación de las HT en otras fases metabólicas. Se ha descrito un incremento en el nivel de nitrógeno urinario en ranas de verano, pero no de invierno. Además, parece que la  $T_4$ , junto con adrenocorticoides y hormonas neurohipofisarias, puede afectar la permeabilidad al agua y/o las sales de la piel, el mesonefros u otros órganos (véase Gorbman, 1964).

Por otra parte, Rosenkilde (1982) ha propuesto que en anfibios las HT tienen un papel en la movilización de las reservas energéticas durante períodos de actividad en los que la ingestión de alimentos es limitada, como es el caso de la época de reproducción, durante la que se ha observado un descenso del peso hepático en *B. japonicus* (Jolivet-Jaudet *et al.*, 1984). Además, se ha demostrado que la  $T_4$ , aunque es incapaz de promover el crecimiento tras la metamorfosis, aumenta la movilización de reservas energéticas en *X. laevis* (Nybroe *et al.*, 1985).

Se ha descrito un efecto inductor de las HT sobre la actividad de la enzima málica en hígado y músculo de *Bufo melanostictus* (Dey *et al.*, 1989), que parece que sería debido a la estimulación de síntesis *de novo* de proteínas enzimáticas específicas y que la desyodación de  $T_4$  a  $T_3$  sería necesaria para la acción hormonal (Dey *et al.*, 1989). Recientemente, también se ha observado en anfibios adultos (*Rana temporaria*) que los cambios estacionales

de algunas enzimas mitocondriales hepáticas están bajo la influencia de la actividad tiroidea (Wróbel *et al.*, 1992; Wróbel y Frendo, 1993).

La relación entre el estado tiroideo y la **estructura de la piel**, tanto en anfibios como en el resto de los vertebrados, se reconoce desde hace muchos años. El fenómeno de la muda se divide en dos procesos normalmente consecutivos: a) proliferación epidérmica y queratinización y b) descarte de la epidermis queratinizada. El espacio de tiempo que transcurre entre mudas se denomina intermudas. El primer proceso es más o menos independiente de hormonas, mientras que la pérdida del estrato córneo superficial y la frecuencia de intermudas están bajo control hormonal. Parece ser que la periodicidad de la muda en anfibios está controlada por el nivel absoluto de HT y es independiente de una liberación cíclica o de un aumento en HT (Jørgensen y Larsen, 1961). En este sentido, la administración de  $T_4$  aumenta la frecuencia de muda, aunque la ausencia de HT no afecta a la misma (Rosenkilde, 1982).

También se han descrito, en trabajos aislados y en general bastante antiguos, algunas acciones sobre el sistema nervioso y procesos de regeneración: En cuanto al **sistema nervioso**, los escasos datos existentes indican que la  $T_4$  estimula la sensibilidad umbral de los nervios periféricos (véase Gorbman, 1964). Más recientemente se ha observado, en contra de lo que se creía, que las HT también tienen efectos morfogénicos en el sistema nervioso central de anfibios adultos, de manera que el tratamiento prolongado con  $T_4$  cambia el patrón de conectividad retino-tectal en *X. laevis* (Hofmann *et al.*, 1989). Con relación a la **regeneración**, la tiroidectomía e hipofisectomía inhiben la regeneración de las extremidades en salamandras juveniles, y el tratamiento posterior con pequeñas dosis de HT restablece la **capacidad regeneradora**, mientras que dosis elevadas inhiben la regeneración por causar una diferenciación prematura de los tejidos (véase Gorbman, 1964). También se ha observado un efecto inhibitor de los fotoperíodos cortos sobre la regeneración en salamandras que parece estar mediado por cambios hormonales que podrían implicar a la función tiroidea (Maier y Singer, 1982).

Las HT son críticas en las respuestas hipermetabólicas de los homeotermos al frío y parece que podrían desempeñar un papel significativo en la modulación de la **termorregulación** en anfibios. Se ha observado que la administración de  $T_4$  estimula un descenso en la temperatura media preferida o seleccionada por individuos adultos de *X. laevis* (Dupré *et al.*, 1986a). Se ha sugerido que esto podría estar relacionado con el efecto calorigénico de las HT, de manera que los individuos tratados con  $T_4$  seleccionarían

temperaturas más bajas para facilitar la pérdida del calor adicional producido como consecuencia de la ya citada estimulación del metabolismo inducido por las HT (Hutchison y Dupré, 1992). Sin embargo, también se ha encontrado que la  $T_3$  induce la selección de temperaturas más elevadas (Dupré *et al.*, 1986a). Por otra parte, en individuos juveniles de *X. laevis* se ha observado una correlación inversa entre la actividad tiroidea y la temperatura ambiental (Dainton, 1991).

La bibliografía relacionada con la influencia de las HT sobre la **reproducción** de anfibios adultos tampoco es muy abundante. Existen evidencias de una implicación directa de las HT en el desarrollo ovárico de anfibios anuros (Sarkar y Rao, 1969, 1971). En *Rana cyanophlyctis*, se observó que la tiroidectomía química o quirúrgica impedía la ovulación, mientras que la administración de  $T_4$  permitía la ovulación *in vivo*, pero no *in vitro*, sugiriendo la interacción de las HT con otros factores, posiblemente las gonadotropinas. También se ha descrito un descenso de los niveles plasmáticos de  $E_2$  en plasma de hembras de *R. temporaria*, pero no de *R. ridibunda* tras el tratamiento con IOP (Kühn *et al.*, 1990). Asimismo, la administración de IOP o metimazol (MMI) en machos de *R. ridibunda* tampoco afectó a los niveles de T (Kühn *et al.*, 1990). Por el contrario, en urodelos (*A. tigrinum*) la  $T_4$  parece alterar la sensibilidad de los ovocitos a otras hormonas, como la prolactina (Norris y Duvall, 1981).

Las HT parecen ser necesarias como co-hormonas en la síntesis hepática de vitelogenina inducida por estrógenos en *X. laevis* (Wangh y Schneider, 1982). Recientemente se ha demostrado que una pequeña dosis de  $T_3$  puede potenciar rápidamente la activación por  $E_2$  de genes silenciosos de vitelogenina en cultivos de hepatocitos procedentes de machos adultos de *Xenopus* (Rabelo y Tata, 1993), y que además la  $T_3$  aumenta la autoinducción de ARNm del receptor de  $E_2$  y de su propio receptor tipo  $\beta$ , pero no del  $\alpha$ , en condiciones similares indicando que puede estar desempeñando un papel en la reproducción de anfibios adultos.

En el ciclo vital de los anfibios parece evidente que el **paso del medio acuático al terrestre** se produce con la transformación de la larva en adulto, lo que conlleva toda una serie de adaptaciones al nuevo ambiente (revisado por Hourdry, 1993). Sin embargo, el hecho es que la mayoría de los adultos también están sometidos a cambios de medio, debido a que deben volver al agua para reproducirse. Mientras que en anfibios urodelos parece claro que la  $T_4$  está implicada en la adaptación a la vida terrestre, participando en la regulación de los procesos migratorios junto con la PRL, los datos disponibles en anuros parecen indicar

que no existe tal función de la  $T_4$  (revisado por Rankin, 1991). Además, recientemente se ha observado que la  $T_4$  parece reducir la actividad locomotora o actividad migradora en *B. japonicus* tanto en condiciones naturales como artificiales (Tasaki e Ishii, 1990a,b), a pesar de que estos mismos autores habían propuesto previamente un papel para las HT en este sentido (Tasaki *et al.*, 1986).

Se han descrito otros efectos de las HT en anfibios adultos. Parece ser que los niveles endógenos de  $T_4$  disparan la respuesta humoral inmune en *Bufo regularis*, existiendo una correlación positiva entre estos dos factores (Saad y Ali, 1992). También se ha sugerido que las HT están implicadas en la regulación de la acción de los corticosteroides en hígado de individuos adultos de *X. laevis*, encontrándose que tanto  $T_3$  como  $T_4$  incrementan la capacidad de unión de los receptores de glucocorticoides, siendo la acción de la  $T_3$  mayor en machos que en hembras (Lange *et al.*, 1989).

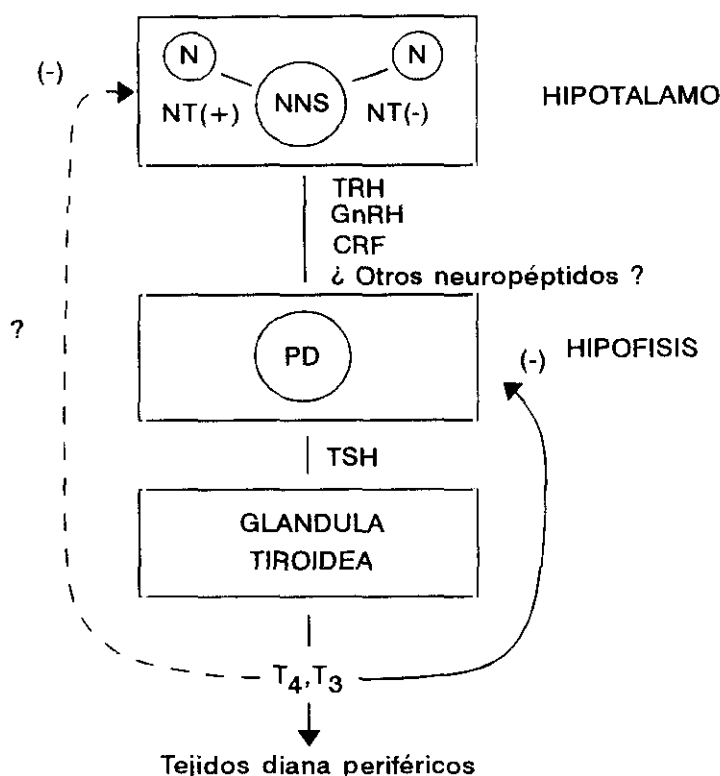
#### **4. REGULACIÓN DEL EJE TIROIDEO EN ANFIBIOS ANUROS.**

El sistema hipotálamo-hipofisario de los vertebrados es responsable de transformar la información neuronal en una respuesta endocrina, la liberación de hormonas al torrente sanguíneo. Este proceso se conoce como integración neuroendocrina. Una gran parte de la información integrada procede del exterior y se refiere a condiciones ambientales, tales como fotoperíodo y temperatura, entre otras. Entre las áreas extrahipotalámicas que influyen de manera importante sobre el eje neuroendocrino destacamos el papel desempeñado por la glándula pineal, considerada como órgano transductor que integra la información ambiental transformándola en señales químicas en forma de indolaminas, especialmente melatonina. Como resultado total de las distintas señales neuroendocrinas se coordinan las funciones de los órganos periféricos para permitir la adaptación del animal a los cambios ambientales asegurando la supervivencia y el éxito de las especies.

##### **4.1. Regulación endógena.**

###### **4.1.1. REGULACIÓN CENTRAL: EJE HIPOTÁLAMO-HIPÓFISIS-TIROIDES.**

Desde hace mucho tiempo se sabe que la función tiroidea en anfibios está regulada por la *pars distalis* hipofisaria (Ilustr. 9) a través de la hormona estimuladora del tiroides (TSH) o tirotropina (véase Dodd y Dodd, 1976; Burggren y Just, 1992), a pesar de que la



**Ilustr. 9.** Esquema del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides en anfibios (inspirado en un esquema de Norris, 1985). N, neuronas; NNS, neuronas neurosecretoras; NT, neurotransmisores; PD, *pars distalis*. Las flechas discontinuas indican procesos hipotéticos (?) en anfibios. (+): influencias estimuladoras; (-): influencias inhibitoras.

mayoría de los estudios realizados en este sentido son de tipo indirecto (hipofisectomía y adición de hormonas). En homeotermos, sobre todo en mamíferos, la TSH hipofisaria está fundamentalmente bajo el control hipotalámico positivo a través de la hormona liberadora de tirotropina (TRH), existiendo también una regulación negativa ejercida por otros neuropéptidos, como la somatostatina (SRIH) y aminos, como la dopamina (DA) (véase Morley, 1981; Reichlin, 1986; Samuels *et al.*, 1992) y la serotonina (5-HT) (Broqua *et al.*, 1993).

La **TRH** se ha detectado en extractos cerebrales, sobre todo hipotalámicos, de anuros adultos y de larvas (véase Balls *et al.*, 1985). También se ha descrito su distribución anatómica en el cerebro de individuos adultos y de larvas (Seki *et al.*, 1983; Mimmagh *et al.*, 1987; Lamacz *et al.*, 1989; Taniguchi *et al.*, 1990). Como ocurre con otros muchos neuropéptidos, se ha observado la presencia de TRH en la piel y en otros tejidos, incluyendo la glándula pineal, el tracto intestinal, el timo y la sangre, tanto de adultos como de larvas de anuros (Jackson *et al.*, 1977; King y Millar, 1981; Balls *et al.*, 1985; Lazarus y Attila, 1993). El contenido de TRH cambia durante la vida larvaria; de manera que no es detectable

durante los estados más tempranos del desarrollo, aumentando posteriormente hasta el inicio del clímax (Bray y Sicard, 1982). Después del clímax, la TRH disminuye en cerebro e intestino, aunque sigue aumentando en piel y timo de *Xenopus*. En cualquier caso, la concentración de TRH en el animal completo no sólo no disminuye en el clímax, sino que es incluso más alta en el adulto (Balls *et al.*, 1985). La situación es algo diferente en el cerebro de *R. catesbeiana*, donde los niveles son bajos en todas las zonas cerebrales hasta la prometamorfosis, incrementándose después para mantenerse constante en el adulto (Mimnagh *et al.*, 1987). También se ha demostrado la presencia de TRH inmunoreactiva en la *pars distalis* de larvas prometamórficas de *R. catesbeiana*, si bien estas fibras desaparecen al inicio del clímax (Taniguchi *et al.*, 1990). No obstante, hay que tener en cuenta que la cantidad de TRH disponible para liberarse es el resultado de dos procesos, síntesis y degradación, cuyo grado se desconoce para la mayoría de los órganos de anfibios (Burggren y Just, 1992).

Recientemente, se ha descubierto la existencia de un precursor de la TRH en el cerebro de *X. laevis* (Bulant, *et al.*, 1992), diferente de los encontrados en piel (Kuchler *et al.*, 1990). Además, el gen de este precursor no contiene los elementos promotores característicos de los genes de TRH de mamíferos, lo que sugiere diferencias en la regulación de su expresión.

En mamíferos, es bien conocida la acción de la TRH estimulando la liberación de PRL hipofisaria (véase Morley, 1981). En anfibios, se ha demostrado que la TRH es el principal factor liberador de PRL, *in vitro* (Seki y Kikuyama, 1986a,b; Kikuyama *et al.*, 1987; Seki *et al.*, 1988; Gracia-Navarro *et al.*, 1990; Nakajima *et al.*, 1993a) e *in vivo* (Kühn *et al.*, 1985b; Malagón *et al.*, 1989). Además, parece ser que se produce una estimulación de la síntesis de PRL por efecto de la TRH (Castaño *et al.*, 1992; Nakajima *et al.*, 1993). También se ha observado que algunos análogos de la TRH como los tripéptidos metilados, pero no sus metabolitos, estimulan la liberación de PRL *in vitro* (Sakai *et al.*, 1991a). Sin embargo, recientemente se ha comprobado que la TRH metilada no está presente en el cerebro de *R. catesbeiana* (Nakajima *et al.*, 1993b). Por otra parte, se sabe que la PRL posee una actividad antimetamórfica (Kikuyama *et al.*, 1980; Yamamoto y Kikuyama, 1982; Alonso-Bedate y Delgado, 1983), aunque parece que esta acción de la PRL como antagonista de las HT se ejerce a nivel periférico (Kikuyama, 1989; Molitch *et al.*, 1993). Por otra parte, en urodelos se ha descrito un efecto de la oPRL potenciando la acción de la oTSH sobre la liberación de T<sub>4</sub> tiroidea *in vitro* (Anderson y Dent, 1982). Sin embargo, en el

laboratorio del Dr. Kikuyama utilizando un bioensayo homólogo no hemos observado ningún efecto de la PRL (0,2-20  $\mu\text{g/ml}$ ) de origen anfibio (purificada a partir de hipófisis de *R. catesbeiana*) sobre la acción de la TSH de origen anfibio (0,01-0,02  $\mu\text{g/ml}$ ) en la secreción de  $T_4$  *in vitro* en tiroides procedentes de larvas de *R. catesbeiana* (Gancedo *et al.*, datos sin publicar). Por último, las células somatotropas de la hipófisis, productoras de la hormona del crecimiento (GH), de adultos de *Rana perezi* responden a TRH *in vivo* e *in vitro* (Gracia-Navarro *et al.*, 1991), y también se ha descrito un efecto estimulador de la TRH sobre la liberación *in vitro* de melanotropina ( $\alpha$ -MSH) en anfibios (Leroux *et al.*, 1983; Verburg-Van Kemenade *et al.*, 1987), mediado por una estimulación del metabolismo de los polifosfoinosítidos (Desrues *et al.*, 1990).

Se ha observado la presencia de TRH en células hipofisarias de mamíferos y parece que esta TRH es producida localmente, ya que se ha detectado la presencia de ARNm de TRH en la hipófisis anterior de humanos (Pagesy *et al.*, 1992). También se ha detectado la existencia de ARNm del receptor de la TRH en el sistema nervioso central y en la retina de rata (Sato *et al.*, 1993). La TRH hipofisaria, actuando como neurotransmisor o neuromodulador, podría desempeñar una función importante en la regulación del eje tiroideo tanto en homeotermos como en poiquilotermos (Jackson y Reichlin, 1974). En machos adultos de *X. laevis* se ha descrito una acción de la TRH facilitando el comportamiento locomotor y reproductor, lo que apoya la hipótesis de que la TRH actúa como neurohormona o neurotransmisor en áreas específicas del cerebro de anfibios (Taylor y Boyd, 1991), como había sido sugerido previamente (Jackson *et al.*, 1977).

En poiquilotermos, aunque en general se ha establecido la existencia de un control hipotalámico estimulador de las células tirotrópicas hipofisarias, no parece que la TRH sea la única responsable del mismo. Así, la mayoría de los intentos de estimular la función tiroidea mediante administración del tripéptido de origen mamífero fueron inútiles durante años (véase Dodd y Dodd, 1976; Dickhoff y Darling, 1983; Norris, 1983; Dent, 1988). Posteriormente, se demostró que la TRH era capaz de activar la liberación *in vitro* de TSH en reptiles adultos y recién eclosionados (Preece y Licht, 1987; Denver y Licht, 1988a; Denver y Licht, 1989a; Licht y Denver, 1988), aunque no afectaba a los niveles de  $T_4$  en plasma (Sawin *et al.*, 1981b).

Se han descrito algunos efectos positivos de la TRH sobre el eje tiroideo en adultos de varias especies de anfibios anuros (*Bufo bufo*: Rosenkilde, 1979; *Rana ridibunda*: Darras y Kühn, 1982; *R. pipiens*, *X. laevis* e *Hyla regilla*: Denver, 1988; *R. perezi*: Malagón *et al.*,

1989; Gracia-Navarro *et al.*, 1990; Castaño *et al.*, 1992; *R. esculenta*: Jacobs y Kühn, 1992). También se ha observado una acción positiva de la TRH sobre el eje tiroideo del ajolote *A. mexicanum* metamorfoseado, pero no en el neoténico (Jacobs *et al.*, 1988a; Darras y Kühn, 1983), aunque en este último sí se encontró un efecto estimulador de TSH de origen bovino, como ya había sido observado *in vitro* en adultos de otro urodelo (*N. viridescens*) donde, sin embargo, la TRH tampoco afectó a la liberación de  $T_4$  (Anderson y Dent, 1982). Por otra parte, Denver y Licht (1989b) no encontraron un efecto de la TRH en larvas de *R. catesbeiana*. Más recientemente, se ha observado una falta de efecto de TRH sobre la concentración de  $T_4$  y la metamorfosis inducida por  $T_3$  en larvas de *R. catesbeiana* y *Scaphiopus hammondi* (Denver, 1993). En nuestro laboratorio, tampoco pudimos observar un efecto de TRH sobre el crecimiento y la metamorfosis de larvas de *Discoglossus pictus* (Alonso-Bedate *et al.*, datos sin publicar).

Durante los últimos años, se han probado otros neuropéptidos de origen mamífero, como la hormona liberadora de gonadotropinas (GnRH) y el factor u hormona liberadora de corticotropina (CRF), como candidatos potenciales de la actividad TRH en anfibios. Jacobs y colaboradores (1988b) demostraron una elevación de la  $T_4$  plasmática producida por inyecciones de **GnRH** en varias especies de ránidos adultos. De igual forma, Jacobs y Kühn (1988) observaron un aumento de los niveles plasmáticos de  $T_4$  en ajolote neoténico tras inyectar GnRH de origen mamífero. Además, se ha demostrado que la GnRH de mamífero también estimula la secreción de TSH *in vitro* en adultos de *R. pipiens* (Denver, 1988) y *R. esculenta* (Jacobs y Kühn, 1992). Por el contrario, no se observó ningún efecto de GnRH humana sobre el crecimiento y la metamorfosis de *R. perezi* (Gancedo *et al.*, 1991a).

Por otra parte, estudios recientes realizados en varias especies de vertebrados sugieren que un péptido del tipo del **CRF** (CRF-"like") podría ser un regulador importante de la secreción de TSH. Así, el CRF ovino aumenta los niveles de  $T_4$  en embriones de pollo (Meeuwis *et al.*, 1989) y estimula la liberación *in vitro* de TSH en hipófisis de tortugas, así como otros dos péptidos CRF-"like", la urotensina I de origen teleósteo y la sovagina, que se encuentra en la piel de los anfibios (Denver y Licht, 1989a). En cuanto a los anfibios, el CRF parece poseer una actividad tirotrópica tanto en anfibios adultos como en larvas (Denver, 1988; Jacobs y Kühn, 1989; Jacobs y Kühn, 1992; Denver y Licht, 1989b; Denver, 1993). También se ha demostrado un efecto estimulador de la sovagina sobre la metamorfosis y la concentración de  $T_4$  en larvas de anuros (Denver, 1993).



En cuanto a una posible regulación negativa central, los datos disponibles sugieren que no existe tal tipo de control en anfibios (Gracia-Navarro *et al.*, 1990), aunque en peces teleósteos parece que la TSH está fundamentalmente bajo un control hipotalámico inhibitor (Dickhoff y Darling, 1983; Leatherland, 1988) y en tortugas se ha demostrado en este mismo sentido un papel de la SRIH, pero no de DA (Licht y Denver, 1990).

Los diversos tipos celulares de la hipófisis de anfibios adultos y de larvas han sido identificados por inmunohistoquímica (Doerr-Schott, 1980; Moriceau-Hay *et al.*, 1982). En anuros adultos se ha observado la presencia de células TSH inmunorreactivas utilizando un anticuerpo frente a  $\beta$ TSH humana (*R. ridibunda*: Malagón *et al.*, 1988). En larvas de *X. laevis* se ha observado que el contenido de TSH hipofisario cambia durante el clímax (Dodd y Dodd, 1976; Bray y Sicard, 1982). Las células tirotrópicas han sido localizadas también en *R. perezi* y *Bufo calamita* a lo largo del desarrollo, observándose que, mientras que en *Bufo* se localizan en la parte ventral de la hipófisis y no presentan cambios de distribución durante la ontogenia, en *Rana* aparecen en la parte central de la glándula en premetamorfosis y en la parte ventral al final de la metamorfosis (García-Navarro *et al.*, 1988). Los autores concluyen que durante la pre- y prometamorfosis se acumula TSH que se libera durante el clímax. Por otra parte, no se dispone de datos relacionados con niveles circulantes o receptores tiroideos de TSH en anfibios (Kikuyama *et al.*, 1993), a pesar de que se ha conseguido purificar TSH a partir de hipófisis de *R. catesbeiana* (Mackenzie *et al.*, 1978; Sakai *et al.*, 1987).

En el tiroides de los mamíferos, el metabolismo general de las células foliculares, así como sus funciones especializadas y proliferación, son estimuladas por TSH (Dumont *et al.*, 1992), pero los mecanismos y la cinética implicada varía según las especies, de modo que en algunas especies sólo se activa la cascada del AMPc (Mockel *et al.*, 1991), y en otras, como en humanos, se activa también la cascada del  $\text{Ca}^{2+}$ -PIP<sub>2</sub> (Raspé *et al.*, 1991). En el primer caso, el AMPc media el aumento en la captación de yoduro y su unión a proteínas, así como la síntesis y secreción de hormonas, mientras que en el segundo caso, el AMPc media la captación y la secreción, y el  $\text{Ca}^{2+}$  y el diacilglicerol estimulan la yodación y la síntesis de HT (Vassart y Dumont, 1992). Otros factores, como las catecolaminas, aminas biógenas y prostaglandinas E, son capaces de mimetizar los efectos de la TSH sobre el tiroides a través de mecanismos acoplados al sistema de la adenilato ciclasa (Carayon y Amr, 1989). Asimismo, el factor de crecimiento epidérmico (EGF), las prostaglandinas F y

algunos neurotransmisores afectan a la acción de la TSH a través de la cascada del  $PIP_2$  (Carayon y Amr, 1989; Dumont *et al.*, 1992).

La mayoría de los autores ha asumido que un aumento en la liberación de TSH hipofisaria incrementa los niveles circulantes de HT en anfibios. Sin embargo, no hay mucha información directa en relación a este punto. Parece ser que el tiroides de anfibios, al igual que sucede en otros poiquilotermos (MacKenzie, 1982; Byamungu *et al.*, 1990), es capaz de responder a otras hormonas glucoproteicas hipofisarias, además de TSH, de modo que, concretamente la hormona luteotrópica (LH), y la foliculotrópica (FSH) en menor medida, de origen anfibio son capaces de estimular la liberación *in vitro* de  $T_4$  (Sakai *et al.*, 1991b). Como parecía lógico suponer, la TSH de origen anfibio presenta con diferencia la mayor actividad tirotrópica, no sólo respecto a la LH y la FSH de origen anfibio, si no también cuando se compara con la acción de la TSH de origen bovino. Sin embargo, la hormona adrenocorticotrópica (ACTH), la PRL y la GH de origen anfibio no afectan a la secreción de  $T_4$  *in vitro* (Sakai *et al.*, 1991b).

La TSH, así como las otras hormonas glucoproteicas hipofisarias (LH y FSH), está compuesta por dos subunidades diferentes denominadas  $\alpha$  y  $\beta$ . Se considera que la subunidad  $\alpha$  de la TSH presenta una secuencia de aminoácidos idéntica a la de la LH y la FSH dentro de una misma especie, desempeñando una función crítica en la actividad biológica a través de su acoplamiento con la subunidad  $\beta$  (Pierce y Parsons, 1981). La localización inmunocitoquímica de las subunidades de estas hormonas glucoproteicas en la hipófisis de larvas e individuos juveniles y adultos de *R. catesbeiana* ha revelado que el número de células inmunorreactivas para la subunidad  $\alpha$  excede la suma de las células inmunorreactivas para las subunidades  $\beta$  (Tanaka *et al.*, 1990, 1991). Recientemente, se ha descrito la secuencia aminoacídica de la subunidad  $\alpha$  en *R. catesbeiana* (Hayashi *et al.*, 1992) y además se ha observado su presencia en gránulos secretorios de células hipofisarias diferentes de las gonadotrópicas o tirotrópicas, concretamente en células lactotrópicas, productoras de PRL, de la misma especie (Tanaka *et al.*, 1992).

Otras hormonas, como los glucocorticoides y los esteroides gonadales, han sido implicadas en la regulación de la secreción de TSH en mamíferos, a nivel hipofisario y/o hipotalámico (véase Morley, 1981; Sharif, 1987; Pekary *et al.*, 1990). También se han descrito diversos efectos de los **corticosteroides** sobre la actividad tiroidea en peces teleósteos (véase Leatherland, 1988; Brown *et al.*, 1991; Redding *et al.*, 1991). En anfibios anuros, los corticosteroides aumentan la acción de las HT acelerando la metamorfosis (véase

Dodd y Dodd, 1976; Kikuyama *et al.*, 1982, 1983; Gray y Janssens, 1990; Hayes *et al.*, 1993), pero esta acción se ejerce a nivel periférico (Niki *et al.*, 1981; Suzuki y Kikuyama, 1983; Galton, 1990).

En cuanto a los **esteroides gonadales**, en animales poiquiloterms, fundamentalmente peces, se han demostrado acciones de diversa naturaleza de estrógenos y andrógenos sobre el eje tiroideo (Oliverau *et al.*, 1981; Chakraborti y Bhattacharya, 1984; Leatherland, 1985; Cyr *et al.*, 1988). Sin embargo, estos efectos parece que se producirían más bien a nivel de la propia glándula tiroidea (Bandyopadhyay *et al.*, 1991). Se han descrito efectos inhibidores de E<sub>2</sub> y testosterona (T) sobre la metamorfosis de anuros *in vivo* (Gray y Janssens, 1990; Hayes *et al.*, 1993), pero no *in vitro* (Gray y Janssens, 1990), sugiriendo un efecto a nivel central. En anfibios adultos, tanto la gonadectomía como la administración de esteroides gonadales (E<sub>2</sub> o T) disminuye los niveles plasmáticos de HT en hembras, pero no en machos, de *R. ridibunda* (Vandorpe y Kühn, 1989; Kühn *et al.*, 1990). Se han identificado células que unen esteroides gonadales en el cerebro de varias especies de anuros (Jørgensen, 1974) y se ha observado la presencia de receptores de estrógenos y andrógenos en el cerebro (Callard, 1983; Lupo *et al.*, 1993), lo que apoyaría un efecto a nivel central también en anfibios adultos.

Otros compuestos procedentes de la hipófisis anterior y que podrían tener un papel en la regulación de la función tirotrópica en mamíferos, son la neurotensina, la neuromedina B, la angiotensina II y la endotelina 3, aunque la importancia fisiológica de estos efectos no se conoce todavía (véase Schwartz y Cherny, 1992). La localización de fibras neuromedina B-"like" inmunorreactivas en la *pars nervosa*, la eminencia media del complejo hipofisario y la adenohipófisis de *R. esculenta* (Panzanelli *et al.*, 1991), sugiere la implicación de esta molécula en la regulación neuroendocrina en anfibios, de manera similar a lo observado en mamíferos, donde se ha descrito un efecto de la neuromedina B sobre la liberación de TSH, pero no de GH y PRL (Rettori *et al.*, 1989). De manera similar, se han localizado lugares de unión para angiotensina II en el sistema nervioso central de *X. laevis*, y el fuerte marcaje observado en la *pars nervosa* y la *pars distalis* de la hipófisis sugiere un papel modulador importante de este péptido en la liberación de las hormonas neuro- y adenohipofisarias (Kloas y Hanke, 1992).

En los mamíferos, el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (véase Ilustr. 9) es un ejemplo de sistema de **retroalimentación negativa** en el que las HT regulan la síntesis y secreción de TSH (Shupnik *et al.*, 1989a). Esta acción de retroalimentación se ha estudiado

fundamentalmente a nivel de la hipófisis anterior (Spira y Gordon, 1986; Shupnik *et al.*, 1989a,b; Iriuchijima *et al.*, 1992), aunque varios estudios han indicado que las HT también pueden actuar directamente sobre el hipotálamo (Taylor *et al.*, 1990; Rondeel *et al.*, 1992), y recientemente se ha sugerido que el principal papel fisiológico de la TRH, procedente del núcleo paraventricular hipotalámico, puede ser regular el punto de ajuste de la retroalimentación negativa ejercida por las HT sobre las células tirotrópicas hipofisarias (Greer *et al.*, 1993).

También se ha demostrado la existencia de una retroalimentación negativa de las HT controlando la secreción de TSH a través de una acción directa sobre la hipófisis en reptiles (Denver y Licht, 1988a,b; Licht y Denver, 1990), y en peces teleósteos (Bres y Eales, 1990), donde también podría producirse a nivel hipotalámico (véase Leatherland, 1987, 1988).

En larvas de anfibios, existen evidencias indirectas de la existencia de este mecanismo de retroalimentación negativa, obtenidas en estudios histológicos del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides a lo largo de la metamorfosis (véase Dodd y Dodd, 1976; Goos, 1978; Rosenkilde, 1979). Así, el tratamiento de larvas con inhibidores de la actividad tiroidea, como el PTU, causaba hipertrofia del tiroides, desgranulación e hipertrofia de las células tirotrópicas, y desgranulación e hiperactividad de zonas del núcleo preóptico implicadas en la síntesis de TRH (Mimnagh *et al.*, 1987). La administración exógena de  $T_4$  producía los efectos inversos (véase Goos, 1978). En anfibios adultos, se ha sugerido recientemente que  $T_3$  y  $T_4$  actúan directamente sobre la *pars distalis* hipofisaria ejerciendo un control de retroalimentación negativa de la secreción de TSH (Jacobs y Kühn, 1992). Además, podría haber diferencias en la sensibilidad a HT de las respuestas de la TSH a distintos factores liberadores hipotalámicos (Jacobs y Kühn, 1992).

Existe bastante bibliografía sobre la relación entre la **glándula pineal** y el eje tiroideo en mamíferos (véase Morley, 1981; Vriend, 1983a,b; Lewinski *et al.*, 1993) sugiriéndose en general un efecto inhibitor de la pineal y de su principal producto hormonal, la **melatonina** (MEL), sobre la función tiroidea, aunque los resultados son conflictivos. La acción de la MEL sobre la función gonadal es bien conocida en mamíferos (Reiter, 1987, 1991) y parece ser el resultado de una acción indirecta, a nivel hipotalámico y/o hipofisario, y posiblemente de una acción directa sobre las gónadas (Martin *et al.*, 1980; Pickering y Niles, 1990; Vanecek y Klein, 1992; Webley y Luck, 1986; Niedziela y Lukaszyk, 1993). Recientemente, se ha propuesto que la *pars tuberalis* adenohipofisaria podría estar modulando la función de la *pars distalis*, sobre todo de las funciones gonadotrópica y tirotrópica, como

mediador de la acción de la MEL, en fetos y adultos de rata (Wittkowski *et al.*, 1992; Holbeck *et al.*, 1993). La *pars tuberalis* está constituida por células secretoras específicas que son las primeras células adenohipofisarias en mostrar signos de actividad secretora coincidiendo con la expresión de receptores de MEL durante el desarrollo de rata (Williams *et al.*, 1991).

En los vertebrados poiquiloterms, se han observado efectos gonadales diversos tras la administración de MEL *in vivo* (véase Vivien-Roels, 1985). La mayoría de los estudios realizados en anfibios, que indican un efecto inhibitor de la MEL sobre el eje gonadal, han sido realizados *in vivo* (de Vlaming, *et al.*, 1974; Delgado *et al.*, 1983; Kupwade y Saidapur, 1986; Alonso-Bedate *et al.*, 1988, 1990; Kasinathan y Gregalatchoumi, 1988), y los pocos experimentos realizados *in vitro* indican en general una falta de efecto directo (Pierantoni *et al.*, 1986; Gancedo *et al.*, 1991b), apoyando una acción central de la MEL.

La acción de la MEL sobre los melanóforos de larvas de anuros, produciendo agregación de los gránulos de pigmento en torno al núcleo, fue el primer efecto descrito para esta hormona (Bagnara, 1963). Se ha demostrado que para ejercer este efecto la MEL se une a un receptor específico de membrana (Sugden, 1991) y que es capaz de inducir desensibilización de los melanóforos *in vitro* dependiendo de la concentración de  $\alpha$ -MSH en el medio (Rollag y Lynch, 1993).

La influencia de la MEL sobre la metamorfosis se ha estudiado *in vivo* en varias especies de anuros y se ha observado que varía dependiendo de la especie, el ciclo luz-oscuridad, y la concentración de MEL utilizada, entre otros factores, aunque en casi todos los casos se ha descrito un retraso del crecimiento y/o desarrollo (Gutiérrez *et al.*, 1984; Delgado *et al.*, 1984, 1987; Alonso-Bedate *et al.*, 1985; Edwards y Pivorun, 1991; Wright *et al.*, 1991). El único estudio del efecto de la MEL sobre la metamorfosis inducida por T<sub>4</sub> *in vitro* (Wright *et al.*, 1991), parece indicar que, al menos parte de la acción de la hormona, se ejerce a nivel periférico.

La MEL es producida en la pineal, como hemos citado con anterioridad, y en la retina de muchas especies (Wiechmann, 1986; Skene *et al.*, 1991; Cahill *et al.*, 1991). En anfibios anuros y concretamente en *R. perezii*, se ha observado que la MEL sintetizada ocularmente contribuye de manera significativa a los niveles circulantes de esta hormona (Delgado y Vivien-Roels, 1989), como se había sugerido ya en larvas de *X. laevis* (Baker, 1969; Baker y Hoff, 1971). Receptores de alta afinidad para MEL han sido descritos en retina y cerebro

de *R. pipiens* (Wiechmann y Wirsig-Wiechmann, 1991, 1993), *R. esculenta* y *X. laevis* (Skene *et al.*, 1993).

#### **4.1.2. REGULACIÓN PERIFÉRICA: TEJIDOS DIANA-DESYODASAS Y RECEPTORES.**

El principal factor que controla la acción de las HT sobre los tejidos periféricos es claramente la cantidad de HT producida por la glándula tiroidea. Sin embargo, también se produce una regulación a nivel de las propias células diana. En este sentido, la acción de las HT puede verse alterada por un cambio en el número de receptores y/o la afinidad de los mismos. Otros elementos susceptibles de regulación serían las enzimas implicadas en el metabolismo de HT.

Cada vez hay más evidencias que apuntan hacia la participación de las hormonas hipofisarias en el control de la **monodesyodación periférica** de  $T_4$  a  $T_3$ . En este sentido, se ha observado un efecto estimulador de la GH en homeotermos (Kühn, 1993; Kühn *et al.*, 1986a,b, 1987a, 1993a).

También en peces teleósteos se han descrito efectos generalmente estimuladores de la GH, tanto de origen homólogo como heterólogo, sobre la 5'D hepática *in vivo* (De Luze y Leloup, 1984; MacLatchy y Eales, 1990; De Luze *et al.*, 1989; Yamada *et al.*, 1993), aunque se ha observado una falta de efecto en microsomas de hepatocitos aislados (Sweeting y Eales, 1992c). También se ha encontrado un efecto positivo de la GH ovina sobre la 5'D en branquias (Yamada *et al.*, 1993). Por otra parte, la PRL ovina, pero no la de salmónidos, estimula la 5'D en anguila (De Luze y Leloup, 1984; De Luze *et al.*, 1984, 1989). Sin embargo, parece que la actividad 5D sería independiente de la hipófisis en tilapia (Byamungu *et al.*, 1990).

En los anfibios, las inyecciones de GH y PRL de origen anfibio no alteraron la actividad 5'D en riñón, piel, hígado o tejido adiposo de adultos de *R. ridibunda*, aunque sí se observó un descenso de esta actividad en riñón tras hipofisectomía (Kühn *et al.*, 1990).

Otras hormonas, como los glucocorticoides y los esteroides sexuales, parecen ejercer un control sobre la monodesyodasa en vertebrados. Así, se ha demostrado un efecto de estrógenos y glucocorticoides sobre la actividad 5'D hepática en homeotermos (Galton, 1971; Decuyper *et al.*, 1983; Kühn, 1990). En cuanto a los poiquilotermos, existen datos que apoyan un efecto estimulador del cortisol y la testosterona sobre la 5'D hepática en peces

(Vijayan *et al.*, 1988; MacLatchy y Eales, 1988), mientras que el estradiol parece inhibirla (Cyr *et al.*, 1988). Recientemente, se ha descrito un efecto inhibitor del  $E_2$  sobre la actividad 5'D, y un efecto estimulador sobre la 5D, en varios tejidos de una especie de salmónido (*O. masou*: Yamada *et al.*, 1993). En este mismo estudio no se encontró ningún efecto de la T sobre la actividad 5'D sugiriéndose que la respuesta podría depender del estado de desarrollo de los animales, y el cortisol sólo indujo un aumento de la 5'D en branquias (Yamada *et al.*, 1993).

Por otra parte, no se ha observado un efecto de los corticosteroides sobre la 5'D renal en anfibios adultos (Kühn, 1990). Sin embargo, parece que en larvas de *R. catesbeiana* sí se produce un efecto positivo de la corticosterona sobre el "turnover" de HT y la desyodación periférica de  $T_4$  (Galton, 1990). La administración de  $E_2$ , pero no la ovariectomía, disminuye la actividad 5'D en *R. ridibunda* (Vandorpe y Kühn, 1989). En machos de la misma especie la gonadectomía tampoco afectó a la actividad 5'D (Kühn *et al.*, 1990).

Con relación al efecto de las HT sobre la desyodación periférica, en situaciones de hipotiroidismo experimental (tratamiento con inhibidores, tiroidectomía, dietas bajas en yodo) se observa un incremento de la actividad 5'D II y un descenso de la 5'D III en distintas zonas del cerebro de ratas adultas (Kaplan, 1984; Serrano-Lozano *et al.*, 1993; Thakare *et al.*, 1993), fetos y neonatos (Obregón *et al.*, 1991), mientras que disminuye en hígado (tipo I) (Keck *et al.*, 1990; Thakare *et al.*, 1993; Obregón *et al.*, 1991). Asimismo, el aumento de los niveles de  $T_4$  en plasma induce un incremento de la actividad 5'D I hepática en ratas (Keck *et al.*, 1990).

Se ha demostrado en peces que la  $T_3$  autorregula su producción hepática (Eales *et al.*, 1990) actuando directamente sobre los hepatocitos mediante modificaciones de las rutas de desyodación (Sweeting y Eales, 1992). De este modo, la administración exógena de  $T_3$  en trucha arco iris (*O. mykiss*) suprime la producción endógena de  $T_3$  mediante la inhibición de la 5'D hepática, sin alterar prácticamente los niveles circulantes de  $T_4$ , y además se desarrolla una dependencia de  $T_3$  (Eales y Finnson, 1991). Recientemente, se ha llevado a cabo un estudio completo del efecto de  $T_3$  y  $T_4$  sobre las distintas actividades desyodasas de varios tejidos de la trucha arco iris, concluyéndose que la  $T_3$  deprime las actividades 5'D de alta y baja afinidad, mientras que induce un incremento de las actividades 5D que transforman  $T_4$  en  $rT_3$  y  $T_3$  en  $T_2$ . Sin embargo, las repuestas a  $T_4$  se restringen

principalmente a la inhibición de la 5'D de alta afinidad en hígado y riñón (MacLatchy y Eales, 1993).

La correlación observada entre los niveles circulantes de HT y la actividad 5'D durante la metamorfosis de anfibios anuros sugiere la existencia de una regulación de este proceso ejercida por las propias HT, como se ha demostrado en larvas pre- y prometamórficas (Buscaglia *et al.*, 1985; Galton, 1988b; Ando *et al.*, 1991). En este sentido, se ha observado que la administración de  $T_3$  y  $T_4$ , a dosis capaces de inducir metamorfosis, provoca una estimulación de la 5'D similar a la observada en clímax y este efecto desaparece cuando cesa el tratamiento (Buscaglia *et al.*, 1985). Sin embargo, en el ajolote neoténico no se observa un incremento de la 5'D tras el tratamiento con  $T_4$  en dosis que inducen metamorfosis anatómica (Galton, 1992). Por otra parte, las HT podrían inducir un descenso en la actividad 5D hepática, ya que ésta es alta cuando los niveles de HT son bajos y disminuye en clímax (Galton, 1988b).

En cuanto a la regulación periférica a nivel de **receptores**, como ya hemos citado anteriormente, los corticosteroides, principalmente aldosterona y corticosterona en anfibios, aceleran la metamorfosis inducida por HT (Kikuyama *et al.*, 1982) y se ha demostrado que esta acción está mediada, al menos en parte, por un aumento en la capacidad de unión nuclear para  $T_3$  sin afectar a la afinidad, en *B. japonicus* (Niki *et al.*, 1981) y *R. catesbeiana*, requiriendo síntesis *de novo* de proteínas y ARN (Suzuki y Kikuyama, 1983). En cuanto a la conocida acción antimetamórfica de la PRL (Kikuyama, 1989), también parece ejercerse a nivel periférico (véase Kikuyama *et al.*, 1988). Así, se ha demostrado que la PRL inhibe tanto la morfogénesis como la muerte celular programada inducida por  $T_3$  en cultivos organotípicos de larvas de *Xenopus* (Tata *et al.*, 1991). El mecanismo por el cual la PRL actúa parece implicar al AMPc (Yamamoto *et al.*, 1979). Además, se ha observado recientemente que la PRL anula la autoinducción temprana del ARNm de los receptores de HT  $\alpha$  y  $\beta$  que lleva a cabo la  $T_3$  *in vivo* e *in vitro* en *Xenopus*, sugiriendo que este mecanismo podría explicar la acción antimetamórfica de la PRL (Baker y Tata, 1992), ya que también se inhibió la posterior inducción *de novo* del gen de queratina que se sabe que es un gen diana de la  $T_3$ .

La administración de  $T_3$  modifica la cantidad de receptores de HT a través de un aumento en la degradación de los mismos en mamíferos (Samuels *et al.*, 1982), y



probablemente en peces teleósteos (Omeljaniuk y Eales, 1985). Alternativamente, podría producirse un incremento de la capacidad máxima de unión, aunque otros factores, como el balance energético, parecen influir (Morovat y Dauncey, 1990). También se ha demostrado una regulación positiva de la expresión génica de los receptores de HT ejercida por las HT (Lebel *et al.*, 1993). Sin embargo, la regulación del número de receptores de HT, comparado con la regulación de la 5'D, no parece ser determinante del estado tiroideo periférico (Eales, 1990). Es importante destacar que, precisamente debido a la desyodación que se lleva a cabo en los tejidos, los niveles circulantes de HT no siempre reflejan las concentraciones intracelulares (Larsen *et al.*, 1981; Duellman y Trueb, 1986), que a su vez determinarían el grado de ocupación de los receptores. En este sentido, se ha demostrado que la T<sub>3</sub> que se encuentra unida a receptores putativos de HT en hígado y branquias de trucha es generada dentro de los propios tejidos en un elevado porcentaje (MacLatchy y Eales, 1992b), resaltando una vez más la importancia de la desyodación periférica en la determinación de la actividad tiroidea global.

En larvas premetamórficas de *R. catesbeiana*, el tratamiento con T<sub>4</sub> induce cambios morfológicos sustanciales que van acompañados de un incremento del número de receptores de HT, pero no de la afinidad de los mismos, en núcleos de eritrocitos (Galton, 1984; Moriya *et al.*, 1984), pero no de células hepáticas (Galton, 1986). Asimismo, se ha descrito un aumento del número de receptores de HT inducido por T<sub>4</sub> en núcleos de la aleta caudal, donde también se observa este aumento de receptores de HT durante el desarrollo espontáneo (Yoshizato y Frieden, 1975). Sin embargo, en *A. mexicanum* el tratamiento con HT no aumentó el número de receptores en eritrocitos, aunque podría deberse a que ya hubieran alcanzado el máximo, ya que los individuos estaban bastante avanzados en el desarrollo (Galton, 1992).

La administración tanto de T<sub>3</sub> como de T<sub>4</sub> a larvas en cualquier estado provoca un máximo del número de receptores nucleares de HT en eritrocitos equivalente al observado durante el clímax espontáneo (Galton, 1988b). Por otra parte, se ha demostrado recientemente, en larvas premetamórficas de *R. catesbeiana*, que la inducción *in vivo* de receptores de HT ejercida por T<sub>3</sub>, en eritrocitos y hepatocitos, se reproduce *in vitro* (Thomas *et al.*, 1992; Helbing *et al.*, 1992) y que, en eritrocitos, depende de síntesis de ARN y proteínas (Thomas *et al.*, 1992). Además, la autoinducción de los receptores de HT que se produce durante la metamorfosis se reproduce en una línea celular de *Xenopus* (XTC-2), y parece que están implicadas proteínas intermediarias (Machuca y Tata, 1992).

Se ha estudiado la expresión de los receptores de HT  $\alpha$  y  $\beta$  y de sus genes durante la metamorfosis de *X. laevis* y *R. catesbeiana* (Yaoita y Brown, 1990; Yaoita *et al.*, 1990; Kawahara *et al.*, 1991; Schneider y Galton, 1991) y se ha observado que la T<sub>3</sub> produce autoinducción del ARNm de los receptores  $\alpha$  y  $\beta$ , siendo una de las respuestas más tempranas de la actividad génica a T<sub>3</sub> (Yaoita y Brown, 1990; Kawahara *et al.*, 1991).

Por último, el tiroides de mamíferos tiene la capacidad de regular la cantidad de yoduro que capta y la cantidad de hormona que sintetiza, incluso en ausencia de TSH, de forma que se habla de la existencia de una **autorregulación tiroidea**, que tiene como principal objetivo escapar del efecto inhibitor que supondría un aporte excesivo de yoduro (efecto Wolff-Chaikoff), de manera que entraría en funcionamiento un mecanismo intratiroideo de retroalimentación negativa reduciéndose el transporte activo de yoduro (Escobar *et al.*, 1992).

## 4.2. Regulación ambiental.

### 4.2.1. CAMBIOS ESTACIONALES Y DIARIOS EN LA FUNCIÓN TIROIDEA.

La hipótesis de que la función tiroidea podía estar regulada por factores ambientales, surgió, en parte, a la luz de observaciones que ponían de manifiesto la existencia de **cambios estacionales** de la actividad tiroidea. Los cambios cíclicos de la función tiroidea siguen patrones muy variados en los distintos grupos de animales y, en general, su conocimiento es bastante limitado desde el punto de vista de su regulación e importancia fisiológica. En algunos casos, las alteraciones estacionales de la función tiroidea coinciden con el desarrollo sexual o cambios de temperatura; mientras que en otros, el fotoperíodo parece ser el principal factor ambiental implicado. Otros factores, como la alimentación, parecen tener también una función importante en este sentido. Por otra parte, es frecuente que se produzcan interacciones entre los factores endógenos y los ambientales, complicando en gran medida las aproximaciones experimentales para el estudio de la influencia ambiental y la interpretación de los resultados obtenidos. Además, las variaciones específicas son casi una norma en lugar de una excepción (Brown, 1988).

Numerosos estudios realizados en mamíferos (conejo: Saad y Baylé, 1985; ballena: Aubin y Geraci, 1989; ciervo: Bubenik y Brown, 1989; rata: Herrmann *et al.*, 1990) y aves

(palomas: Saarela *et al.*, 1986; pingüino: Groscolas y Leloup, 1986; ganso: George y John, 1990) han puesto de manifiesto la existencia de cambios estacionales de la función tiroidea

Existen también bastantes estudios que describen cambios estacionales en distintos parámetros de la función tiroidea en peces (Eales y Fletcher, 1982; Chakraborti y Bhattacharya, 1984; Ueda *et al.*, 1984; Grau *et al.*, 1985; Leatherland, 1987; Brown, 1988; Stryjek-Kaminska *et al.*, 1988; Youngson y McLay, 1989) y reptiles (Vivien-Roels, 1969; Bona-Gallo *et al.*, 1980; John-Alder, 1984; Kar y Chandola-Saklani, 1985; Licht *et al.*, 1985; Licht *et al.*, 1991b). Sin embargo, los datos disponibles en anfibios no son tan abundantes.

Las alteraciones estacionales en el grado de desarrollo de larvas de anuros se deben en gran medida a los efectos de la temperatura sobre la secreción de HT y la capacidad de respuesta de los tejidos a las mismas (véase Dodd y Dodd, 1976). El desarrollo ocurre más rápidamente durante el clímax, y este mayor grado de desarrollo se ve aumentado por el hecho de que las larvas metamórficas seleccionan temperaturas acuáticas superiores (Wollmuth y Crawshaw, 1988). En otoño se produce una interrupción en el desarrollo que parece deberse a una inactivación del eje tiroideo como consecuencia del descenso en la temperatura (véase Dodd y Dodd, 1976). Recientemente se han aportado datos que revelan la existencia de un ritmo anual que afecta al grado de desarrollo y a la regulación comportamental de la temperatura corporal en larvas de *R. catesbeiana*, estando implicadas probablemente las HT (Crawshaw *et al.*, 1992).

La actividad del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides varía estacionalmente en anfibios adultos. En este sentido, los niveles hipotalámicos de TRH en *R. pipiens* son menores en primavera que en otoño o invierno (Jackson *et al.*, 1977). Las células tirotrópicas hipofisarias y las células foliculares tiroideas muestran variaciones estacionales paralelas (Rosenkilde, 1979). También se han descrito cambios estacionales en la capacidad de respuesta a los distintos factores hipotalámicos que estimulan la función tiroidea a nivel hipofisario. Así, la GnRH es más potente que la TRH estimulando los niveles plasmáticos de  $T_4$  en *R. ridibunda* en Noviembre. Sin embargo, en Febrero menos de la mitad de los individuos de *R. temporaria* respondieron a GnRH (Jacobs *et al.*, 1988b). Las diferencias observadas podrían deberse a la especie o a la temperatura. También se producen distintas variaciones estacionales de la actividad tiroidea dependiendo de las especies. La captación de yodo por el tiroides a temperaturas bajas disminuye en *B. bufo* (véase Herman, 1992) y aumenta en *R. temporaria* (Ceusters *et al.*, 1978). El contenido tiroideo de  $T_3$  y  $T_4$  es bajo durante el

invierno en *R. ridibunda*, y aumenta rápidamente tras la hibernación alcanzando niveles máximos en Mayo-Junio. En cuanto a los niveles plasmáticos de HT, la  $T_3$  se mantiene baja en Diciembre y Marzo y la  $T_4$  muestra concentraciones bajas durante el invierno seguidas de un patrón bifásico (Kühn *et al.*, 1985a) o monofásico (Vandorpe *et al.*, 1987). En *Bufo viridis* se observa un máximo en los niveles séricos de  $T_4$  al principio del verano y niveles más bajos al principio del otoño (Rosenkilde y Jørgensen, 1977), mientras que *B. bufo* presenta niveles de  $T_4$  más altos durante la hibernación y la época de reproducción primaveral que en verano y otoño (Rosenkilde y Jørgensen, 1977; Rosenkilde, 1982), al igual que ocurre en *A. tigrinum* (Norris *et al.*, 1977), lo que sugiere la posibilidad de que los niveles hormonales estén inversamente relacionados con la temperatura ambiental. En *B. japonicus* se encuentran dos picos en el ciclo anual de HT, de forma que la primera elevación comienza al principio del invierno, alcanzando el máximo en Marzo. El segundo pico, menos pronunciado, aparece cuando los animales llegan al agua, dónde se llevará a cabo la reproducción (Tasaki *et al.*, 1986). Niveles bajos de  $T_4$  plasmática durante la época de reproducción e hibernación en *B. regularis* contrastan con niveles elevados en verano (Saad y Ali, 1992). También se han observado cambios estacionales en la actividad 5'D en homogeneizados de riñón y piel de machos de *R. ridibunda*, con niveles altos en Abril-Junio seguidos de un mínimo en Julio-Agosto. El hecho de que esta actividad enzimática presente cambios opuestos a los de la  $T_4$  plasmática parece indicar que efectivamente refleja cambios en la monodesyodación periférica de  $T_4$  a  $T_3$  (Vandorpe *et al.*, 1987). Todos los trabajos anteriormente citados describen cambios estacionales de la función tiroidea en especies de regiones templadas. Sin embargo, también se han demostrado variaciones anuales en el contenido tiroideo y la concentración plasmática de  $T_4$  en hembras, pero no en machos, de *Dicroglossus occipitalis*, especie ecuatorial que experimenta condiciones ambientales prácticamente constantes a lo largo del año (Kühn *et al.*, 1987b,c).

En relación a los **ritmos diarios** de la actividad tiroidea, que está establecida en mamíferos (Nicolau y Haus, 1992), se han realizado estudios que indican la existencia de tales ritmos en algunas especies de peces teleósteos (véase Brown, 1988; Leatherland *et al.*, 1992; Spieler, 1992). En reptiles, los pocos datos disponibles parecen indicar que no se producen fluctuaciones significativas en los niveles de  $T_4$  (Licht *et al.*, 1985).

En anfibios, muy pocos estudios han analizado cambios diarios de la actividad tiroidea. En un estudio realizado en salamandras neoténicas (*A. tigrinum*), los niveles

plasmáticos de HT presentaron variaciones circadianas en Mayo, pero no en Octubre (Norris *et al.*, 1981). Por otra parte, se ha descrito la existencia de un ritmo diario de HT tanto en plasma como en tiroides de machos de *R. ridibunda* en Octubre y Diciembre (Kühn *et al.*, 1983). También se ha sugerido la existencia de variaciones circadianas de la actividad 5'D en homogeneizados renales de machos de *R. ridibunda* (Kühn *et al.*, 1990).

Otros estudios, llevados a cabo en larvas, han intentado otro tipo de aproximación experimental en la que se analiza el efecto de la administración de  $T_4$  en distintos momentos del ciclo diario de luz-oscuridad (L:D), simulando ritmos circadianos de secreción hormonal, sobre distintos parámetros metamórficos. En este sentido, se han observado variaciones circadianas en la capacidad de respuesta de los tejidos diana a la  $T_4$ , de modo que los cambios metamórficos y proliferativos son más rápidos cuando la  $T_4$  se administra durante la fase de luz (Wright *et al.*, 1986, 1990; Burns *et al.*, 1987). Por otra parte, el tratamiento con un pulso de luz de una hora de duración, antes o después de la administración de  $T_4$ , contrarresta el retraso metamórfico resultante del tratamiento con  $T_4$  al principio de la fase oscura (Wright *et al.*, 1988a).

En muchas ocasiones se superponen ritmos diarios y estacionales de la función tiroidea, dando lugar a complicados patrones de actividad.

#### **4.2.2. EFECTO DE LA LUZ Y DEL FOTOPERÍODO.**

La manipulación del fotoperíodo provoca alteraciones de la función tiroidea en peces. La aclimatación a oscuridad constante generalmente tiene efectos inhibidores al igual que la aclimatación a días largos, mientras que la aclimatación a días cortos tiende a promover la actividad tiroidea. La respuesta a fotoperíodos crecientes o decrecientes puede variar estacionalmente y parece ser más importante que la duración concreta del fotoperíodo (véase Brown, 1988). Un aspecto importante de la regulación ambiental de la función tiroidea en peces teleósteos podría ser el control fotoperiódico de las propiedades del mecanismo de retroalimentación negativa en contraposición a los efectos de la temperatura (Grau *et al.*, 1985; Grau, 1988; Brown, 1988). En este contexto, la reducción de la sensibilidad del mecanismo de retroalimentación negativa inducida por los días cortos podría promover la aparición de respuestas más prolongadas a la TSH, con el efecto neto del mantenimiento de los niveles plasmáticos de HT en un momento (invierno) en el que los efectos de la temperatura tenderían a inhibir la secreción. El efecto opuesto contribuiría a la atenuación de las respuestas a la TSH en verano.

Se ha sugerido que la luz desempeña un papel importante en la regulación del crecimiento y la metamorfosis de anfibios. Existen evidencias que indican que esta acción de la luz se realiza a través del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (véase Dodd y Dodd, 1976). La exposición de larvas de anuros y urodelos a luz continua estimula el desarrollo metamórfico, mientras que la oscuridad constante impide el progreso de la metamorfosis. Así, larvas prometamórficas de *R. pipiens* mostraron un desarrollo más rápido cuando eran sometidas a luz constante (24L) y a un fotoperíodo intermedio (12L:12D) que bajo condiciones de oscuridad continua (24D) (Eichler y Gray, 1976). Resultados similares se obtuvieron con larvas premetamórficas de *R. perezi*, de manera que el crecimiento era mayor en fotoperíodo corto (6L:18D) que en 24D (Delgado *et al.*, 1984). También en *R. pipiens*, se ha observado que los fotoperíodos más largos aceleran la metamorfosis inducida por  $T_4$  (Wright *et al.*, 1988b). Además, se observó que la duración diaria afectaba al progreso de la metamorfosis, de forma que cuanto más corto era el ciclo diario más rápido era el crecimiento (9L:9D > 12L:12D > 15L:15D).

También se han encontrado efectos estimuladores, tanto de fotoperíodos cortos (6L:18D, 1L:23D) como de oscuridad constante (24D), sobre el crecimiento y la metamorfosis de larvas pre- y prometamórficas de *D. pictus* (Delgado *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1984), en comparación con 24L y 14L:10D. Además, se ha observado un efecto inhibitor de 24L sobre el crecimiento y el desarrollo de larvas de *X. laevis* (Delgado *et al.*, 1987). En esta misma especie, también se ha descrito un mayor grado de desarrollo y crecimiento en 1L:23D que en 23L:1D (Edwards y Pivorun, 1991). En urodelos, larvas y adultos, se ha observado un efecto depresor de la iluminación constante (Grant y Waterman, 1961).

Por otra parte, Crawshaw y colaboradores (1992) encontraron que la influencia del fotoperíodo sobre el desarrollo metamórfico de *R. catesbeiana* varía estacionalmente, incluso manteniendo la temperatura constante. Las larvas mantenidas en fotoperíodo corto al principio del verano se desarrollaron ligeramente más rápido que las de fotoperíodos largos, mientras que al final del verano no se observó ningún efecto del fotoperíodo. A partir de la mitad de Septiembre, vuelve a observarse una acción del fotoperíodo, aunque en este caso fueron las larvas mantenidas en fotoperíodos largos las que se desarrollaron más rápidamente.

En anuros adultos se ha observado que machos de *R. pipiens* sometidos a 24D presentan un mayor contenido de TRH pineal que los sometidos a 24L. Sin embargo, el contenido de TRH hipotalámico no se vió afectado por el grado de iluminación (Jackson *et*

*al.*, 1977). Machos de *R. ridibunda* hibernantes en Enero poseen un menor contenido tiroideo de HT que en Septiembre y Octubre, aunque los niveles circulantes de  $T_3$  se mantienen y los de  $T_4$  incluso aumentan (Kühn *et al.*, 1983). Los autores sugieren que el aumento del fotoperíodo en Enero sería responsable de este aumento en la secreción de  $T_4$  (Kühn *et al.*, 1983, 1985). También se ha observado un efecto estimulador de 24D sobre los niveles circulantes de  $T_4$  y  $T_3$  en individuos adultos de *R. ridibunda* mantenidos a 4°C en Diciembre (Kühn *et al.*, 1990). Además, estos autores encontraron un efecto de la intensidad de la luz en el mismo sentido cuando los animales eran sometidos a fotoperíodo corto (8L:16D) pero no con fotoperíodo largo (14L:10D), de modo que se encontraron niveles más elevados de  $T_4$  plasmática en aquellos animales en los que la intensidad de luz fue menor (500 lux vs 2500 lux), mientras que los niveles de  $T_3$  no se vieron afectados (Kühn *et al.*, 1990).

#### **4.2.3. EFECTO DE LA TEMPERATURA.**

La temperatura tiene en general efectos muy importantes sobre las funciones de todos los animales, que muestran diferentes tipos de relaciones térmicas con su ambiente. Los dos tipos de relaciones térmicas más relevantes son la homeotermia y la poiquilotermia, aunque en la actualidad se tiende más a hablar de endotermia y ectotermia, respectivamente. La diferencia entre estas dos terminologías se basa fundamentalmente en que la primera enfatiza la constancia (homeotermia) o la variabilidad (poiquilotermia) de la temperatura corporal con las condiciones ambientales, mientras que en el segundo caso se pone más énfasis en el mecanismo por el que la temperatura corporal viene determinada, de manera que en los endotermos vendría dada por mecanismos fisiológicos endógenos (termorregulación fisiológica) y en los ectotermos estaría determinada primariamente por las condiciones térmicas externas (Hill y Wyse, 1992). Sin embargo, también los animales poiquilotermos, en mayor o menor medida dependiendo de los grupos animales, pueden llevar a cabo una cierta termorregulación, fundamentalmente de carácter comportamental mediante la selección de su ambiente térmico (Sievert, 1991; Hutchison y Dupré, 1992).

Las mediciones fisiológicas realizadas en anfibios a una temperatura dada pueden no proporcionar siempre los mismos resultados debido a que tales mediciones dependen a menudo de la historia térmica del animal. Este fenómeno es el resultado de las respuestas bioquímicas y fisiológicas a la exposición continua a una determinada temperatura y se conoce en general como aclimatación a la temperatura. Sin embargo, en la bibliografía pueden encontrarse distintas definiciones para la expresión "aclimatación térmica" (Rome *et*

*al.*, 1992). La más general hace referencia exclusivamente a la exposición durante un tiempo suficientemente largo (días o semanas) a una temperatura concreta, es decir es equivalente a la historia térmica del animal. Una definición más estricta requeriría que el animal experimente algún cambio en el parámetro estimado tras su exposición al frío o al calor. Generalmente, en los diseños experimentales habituales se utiliza una mezcla de estas dos definiciones, de manera que suele denominarse temperatura de aclimatación a aquella utilizada durante el período experimental, siendo su principal objetivo, sin embargo, la detección de un posible efecto de la temperatura sobre un parámetro fisiológico concreto.

La temperatura desempeña un papel dominante en el control de muchos aspectos de la función endocrina en animales poiquiloterms. Por ejemplo, la función endocrina gonadal es de las más sensibles a la temperatura, mientras que la secreción de HT muestra más variaciones interespecíficas y, en general, una menor termosensibilidad. Sin embargo, la mayoría de la información disponible al respecto procede de estudios *in vivo*, lo que complica enormemente la interpretación de los resultados. Por otra parte, en muchas ocasiones los efectos observados podrían deberse al efecto depresor que tiene la temperatura sobre las reacciones biológicas en general y no a un efecto específico de este factor ambiental sobre una función endocrina concreta.

En peces las temperaturas bajas, al contrario que las altas, tienden a inhibir la secreción de HT (Grau, 1988; Brown, 1988). En la tortuga *P. scripta* la respuesta secretora de las células tirotrópicas hipofisarias a TRH y del tiroides a TSH dependen de la temperatura, de modo que a 5°C las funciones secretoras se suprimen y a 28°C son máximas, pero varían enormemente a temperaturas intermedias (Licht *et al.*, 1989). Por otra parte, la sensibilidad térmica de estos dos componentes del mismo sistema es diferente. Así, la glándula tiroidea es relativamente insensible a la temperatura en comparación con la hipófisis. Además, parece que la supresión de las acciones hormonales por el frío en esta especie se debe fundamentalmente a procesos post-receptor más que a la unión a receptores *per se* (Licht *et al.*, 1990b).

El papel de la temperatura en la fisiología de la metamorfosis de anfibios se estableció hace mucho tiempo. Las temperaturas bajas ( $\leq 5^{\circ}\text{C}$ ) inhiben la metamorfosis y la acción de las HT (Moriya, 1983), y la duración de los estados aumenta según descende la temperatura. El efecto de la temperatura es más marcado a medida que la actividad tiroidea se aproxima a su máximo (véase Dodd y Dodd, 1976). Se ha establecido el grado de desarrollo en función de la temperatura para varias especies de anfibios, pero las tasas de producción y ciculación



de las hormonas así como el grado de sensibilidad de los tejidos diana a las hormonas con respecto a la temperatura permanecen desconocidas en esencia, a pesar de que la producción endocrina también está correlacionada con la temperatura en larvas de anfibios (Duellman y Trueb, 1986). La temperatura podría actuar sobre el eje hipotálamo-hipófisis-tiroides y a nivel tisular. En este sentido, se ha observado una depresión de la secreción de  $T_4$  a temperaturas bajas. También se ha observado que los tejidos de anfibios no unen HT por debajo de los 5°C y además la vida media de las HT aumenta con la temperatura baja (véase Dodd y Dodd, 1976). Sin embargo, recientemente se ha descrito un ritmo estacional de desarrollo en larvas de *R. catesbeiana* en el que parecen estar influyendo otros factores que no son la temperatura, puesto que a temperatura constante (25°C) las larvas se desarrollaron más rápidamente en verano que en invierno (Crawshaw *et al.*, 1992).

En anuros adultos se ha observado que el frío induce un descenso en la captación tiroidea de yodo y en los niveles plasmáticos de  $T_4$  en *Bufo* (véase Kühn, 1990). También se ha descrito un incremento en la captación tiroidea de yodo como respuesta a la elevación de la temperatura en machos, pero no en hembras, de *R. temporaria* (Ceusters *et al.*, 1978). Estos resultados podrían explicarse como una acción de la temperatura sobre la cinética de la reacción implicada. Por otra parte, se observó una relación inversa entre el contenido tiroideo de  $T_4$  y el grado de captación de yodo. Posteriormente, Kühn y colaboradores (1983) encontraron en machos de *R. ridibunda* que la temperatura no afecta a los niveles circulantes de HT en Diciembre aunque afecta a la ritmicidad tiroidea diaria.

Experimentos de aclimatación térmica en anuros adultos han indicado un efecto de la misma sobre el metabolismo oxidativo (Lagerspetz *et al.*, 1974; Chiu y Tong, 1979; Pérez-Campo *et al.*, 1990), sugiriéndose que estos efectos de aclimatación metabólica son mediados por el tiroides (Lagerspetz *et al.*, 1974).

#### **4.2.4. EFECTO DE LA ALIMENTACIÓN.**

Estudios realizados en mamíferos, aves y peces indican que las alteraciones en la cantidad o el patrón de ingesta afecta a la función tiroidea a distintos niveles, desde la liberación de TSH hasta las acciones post-receptor de las HT a nivel celular (véase Danforth y Burger, 1989; Eales, 1988). Cambios agudos y crónicos de la ingestión de nutrientes provocan fundamentalmente cambios tiroideos a dos niveles: 1) regulación de la secreción de  $T_4$  a través del control del eje hipotálamo-hipofisario y 2) conversión periférica de  $T_4$  a  $T_3$  e interacción con sus receptores nucleares (Eales, 1988). En trucha (*Salmo gairdneri*) la

alimentación incrementa la  $T_4$  plasmática a corto plazo (Cook y Eales, 1987). Sin embargo, en carpa dorada (*Carassius auratus*) no se observa este efecto (Spieler y Noeske, 1984), aunque sí se aprecia un descenso de los niveles plasmáticos de HT, así como de la fracción libre tiroidea de  $T_4$ , tras dos días de ayuno (De Pedro *et al.*, 1994b).

Los estudios de la relación de la alimentación y la metamorfosis de anfibios han tratado fundamentalmente del efecto del ayuno y de diferentes nutrientes o tipos de comida específicos, observándose un retraso de la metamorfosis y una inhibición del crecimiento como consecuencia del ayuno en estados tempranos de *R. pipiens* y *R. sylvatica*, aunque en estados tardíos se producía una aceleración de la metamorfosis (véase Kaltenbach *et al.*, 1981). Más recientemente, se ha evaluado la influencia del horario de alimentación en larvas de *R. pipiens* mantenidos en un fotoperíodo 19L:5D, no encontrándose diferencias en el grado de crecimiento o desarrollo metamórfico entre los distintos grupos que habían sido alimentados cada 18, 24 ó 30 h (Wright *et al.*, 1988). En cuanto a los anfibios adultos, los niveles plasmáticos y el contenido tiroideo de HT en machos de *R. ridibunda* no se modificaron por el ayuno. Además, las ranas hibernantes sin alimentar no presentaron niveles circulantes de HT menores que los de los animales no hibernantes y alimentados (Kühn *et al.*, 1983).

## **II. OBJETIVOS**

El conocimiento actual sobre los distintos aspectos del funcionamiento y regulación del eje tiroideo está restringido fundamentalmente a los animales homeotermos, sobre todo mamíferos, siendo muchos de estos aspectos menos conocidos en los poiquilotermos. Dentro de los poiquilotermos es de destacar la escasez de trabajos dedicados a los anfibios y especialmente en individuos adultos. Teniendo en cuenta la importancia que las hormonas tiroideas tienen en multitud de procesos fisiológicos en los distintos grupos de vertebrados, nos planteamos el estudio del eje tiroideo en el anfibio anuro más abundante de España, la *Rana perezi*, de la que, además, no existe ninguna información a este respecto.

El objetivo global de esta Tesis Doctoral ha sido fundamentalmente caracterizar los patrones de actividad tiroidea de larvas y adultos de *R. perezi*, así como profundizar en los factores endógenos y ambientales que los determinan.

En primer lugar era necesaria la puesta a punto del método analítico que ha constituido la base de este estudio por lo que se llevó a cabo la validación de los radioinmunoensayos (RIAs) de hormonas tiroideas, con el objeto de probar su adecuabilidad para la determinación de  $T_3$  y  $T_4$  en muestras procedentes de larvas y adultos de *R. perezi*. Asimismo, se validaron los RIAs de hormonas esteroideas (estradiol, testosterona y progesterona) para distinto tipo de muestras de *R. perezi* que fueron utilizados en algunos diseños experimentales.

La mayoría de los vertebrados que habitan la regiones templadas del planeta presentan variaciones cíclicas, diarias y estacionales, en ciertas funciones tales como la reproducción y la actividad tiroidea. Los estudios de las posibles fluctuaciones diarias de la actividad tiroidea en anfibios son muy limitados (dos estudios según nuestro conocimiento) y nunca se han llevado a cabo durante la metamorfosis, de modo que nos planteamos el estudio de los posibles cambios día/noche de la actividad tiroidea a lo largo de la ontogenia, así como en las distintas estaciones anuales en individuos adultos de *R. perezi*. Asimismo, y teniendo indicios de que la actividad tiroidea de individuos adultos de esta especie podía presentar diferencias relacionadas con el sexo, llevamos a cabo un estudio anual en machos y hembras por separado.

La identidad del factor(es) hipotalámico(s) que regula la liberación de TSH en larvas de anfibios es todavía una cuestión controvertida. Los intentos de estimular en las larvas la función tiroidea mediante la administración del tripéptido TRH, responsable de este control en mamíferos y que también parece actuar en este sentido en anfibios adultos, han sido normalmente infructuosos durante años. En la actualidad varios péptidos hipotalámicos, entre los que destaca el CRF, han surgido como candidatos a ser los responsables de la liberación de TSH en larvas de anfibios. Por tanto, nuestro objetivo fue estudiar el efecto del CRF, de origen ovino y humano, puesto que no se dispone todavía del péptido de origen anfibio, sobre la actividad tiroidea, así como sobre el crecimiento y metamorfosis, de *R. perezi*.

La melatonina, hormona sintetizada en los fotorreceptores oculares y extraoculares de numerosos vertebrados, ha sido implicada en la transducción de señales ambientales actuando como sincronizador de las funciones tiroidea y reproductora. En *R. perezi* se han descrito oscilaciones circanuales y circadianas de los niveles de melatonina, así como distintos efectos sobre la reproducción y la metamorfosis. Teniendo en cuenta lo anteriormente expuesto, se estudió la posible influencia de la melatonina sobre la actividad tiroidea de larvas y adultos de *R. perezi*. Además, y considerando la participación de la melatonina en la regulación de los ciclos reproductores en *R. perezi*, nos planteamos evaluar el posible efecto de esta hormona sobre la producción de esteroides gonadales en fases larvarias.

Parece claro que en muchos vertebrados existe una interacción entre la función tiroidea y gonadal, y de hecho en el estudio estacional observamos un cierto paralelismo entre estas dos actividades, por lo que nos planteamos profundizar en el estudio de las posibles interrelaciones existentes entre estas dos funciones endocrinas y el nivel al que se podían producir. Para ello diseñamos estudios *in vivo* con larvas e individuos adultos, y aproximaciones experimentales *in vitro* con cultivos de ovocitos aislados y tejido tiroideo de ejemplares adultos.

Los anfibios presentan una fuerte dependencia del medio externo, habiéndose constatado en estudios llevados a cabo previamente en nuestro laboratorio el papel clave que el fotoperíodo y la temperatura desempeñan en la estacionalidad de los ciclos reproductores de *R. perezi*. En otros grupos de vertebrados se ha observado que determinados factores

ambientales (temperatura, fotoperíodo y disponibilidad de alimento) participan en el control de la actividad del eje tiroideo. Los trabajos dedicados al estudio de la influencia ambiental sobre la metamorfosis no son muy numerosos, a la par que bastante antiguos, siendo la situación en anfibios adultos incluso más precaria. Por tanto, nuestro último objetivo ha sido analizar el posible efecto de estos tres factores ambientales sobre la actividad tiroidea en *R. perezii*. Para lo cual, y teniendo en cuenta las diferencias que existen entre larvas y adultos, se emplearon diseños experimentales diferentes. En el caso de las larvas, los tratamientos fueron de corta duración con el fin de evitar que el patrón de crecimiento y desarrollo se viera afectado, ya que parece que la aplicación crónica de alguno de estos factores altera estos procesos; mientras que en adultos se utilizaron normalmente tratamientos crónicos. Por otra parte, en el estudio de los cambios diarios observamos diferencias día/noche en la actividad tiroidea de larvas y adultos, con lo que los animales se sacrificaban en dos momentos del fotociclo diario, mediodía y medianoche normalmente.

### **III. MATERIALES Y MÉTODOS**

## 1. MATERIALES.

### 1.1. Productos.

#### a) Reactivos.

- Acetato sódico (6268, Merck)
- Ácido acético glacial (63, Merck)
- Ácido clorhídrico (317, Merck)
- Ácido iopanoico (I-2013, Sigma)
- Ácido ortofosfórico (573, Merck)
- Ácido sulfúrico (131058, Panreac)
- Agua bidestilada (Laboratorios Navarro, S.A. y Panreac)
- Albúmina de huevo (613, Doesder)
- Albúmina sérica bovina (A-7030, Sigma)
- Albúmina sérica bovina al 22%, pH 7,2 (40038, Ortho)
- Bicarbonato sódico (141638, Panreac)
- Carbógeno (SEO)
- CO<sub>2</sub> (Carbueros metálicos)
- Cloroformo (2445, Merck)
- Cloruro cálcico (2083, Merck)
- Cloruro potásico (P-4504, Sigma)
- Cloruro sódico (141659, Panreac)
- DME (074-01600, GIBCO)
- Dowex AG 1x2 (140-1251, BioRad)
- DePex (18243, Serva)
- Eosina amarillenta (251299, Panreac)
- Etanol (983, Merck)
- Éter dietílico (141313, Panreac)
- Formol (071510, Probus)
- Fosfato disódico (6580, Merck)
- Fosfato monopotásico (141509, Panreac)
- Fosfato monosódico (6346, Merck)



- Glicerina (142329, Panreac)
- Hematoxilina (251344, Panreac)
- Hemostático (Espongostan, Leo)
- HEPES (H-3375, Sigma)
- Hidróxido sódico (6498, Merck)
- Metimazol (M-8506, Sigma)
- Parafina (251799, Panreac)
- Polietilenglicol 6000 (807491, Merck)
- Pronasa E (P-6911, Sigma)
- Propiltiouracilo (P-3755, Sigma)
- Timerosal, mertiolato (T-5125, Sigma)
- Tolueno (8317, Merck)
- Tris (T-1503, Sigma)
- Tris-ClH (T-3253, Sigma)
- Tween 80 (P-1754, Sigma)
- Xilol (141769, Panreac)

**b) Hormonas.**

- Estradiol (E-8875, Sigma)
- Gonadotropina coriónica humana, Physex (Leo)
- CRF humano (C-3042, Sigma)
- CRF ovino (VB675, ucb bioproducts)
- Melatonina (M-5250, Sigma)
- Testosterona (T-1500, Sigma)
- Tiroxina (T-2376, Sigma)
- Triyodotironina (T-2877, Sigma)

**c) Kits comerciales.**

- Chromatest glucosa (Knickerbocker)
- Diria-Estrk (Sorin): E<sub>2</sub> estándar, [<sup>125</sup>I]E<sub>2</sub>, Ac antiE<sub>2</sub>, PEG-2°Ac
- Diria-Progk (Sorin): P estándar, [<sup>125</sup>I]P, Ac antiP, PEG-2°Ac
- Diria-Testok (Sorin): T estándar, [<sup>125</sup>I]T, Ac antiT, PEG-2°Ac

**d) Sueros y anticuerpos.**

- Anticuerpo antitiroxina (cedido por la Dra. M.J. Obregón)
- Anticuerpo antitriyodotironina (cedido por la Dra. M.J. Obregón)

**e) Radionucleidos.**

- [<sup>125</sup>I]Tiroxina (cedido por la Dra. G. Morreale)
- [<sup>131</sup>I]Tiroxina (cedido por la Dra. G. Morreale)
- [<sup>125</sup>I]Triyodotironina (cedido por la Dra. G. Morreale)

**1.2. Instrumental.**

- Agitador multitubos (Corning, modelo 4010)
- Aguja 0,5 mm (Luer)
- Balanza digital (Sartorius 1405)
- Balanzas de precisión (Sartorius y Sauter 404)
- Baño de órganos termostatzado (Unitronic, modelo 320 OR)
- Cámara de aclimatación con fotoperíodo y temperatura regulables
- Cámaras de cultivo herméticas transparentes
- Campana extractora
- Cánulas
- Capilares 1,6 y 70 mm (Gricel)
- Centrífuga refrigerada. (Sigma, modelo 3K-2)
- Colorímetro (Atom, modelo Data-test atom 366)
- Congelador a -25°C (Liebherr)
- Contador  $\gamma$  (LKB, modelo 1275 minigamma)
- Estufas de histología (Selecta)
- Evaporador-concentrador (Howe, modelo Giro vap)
- Homogeneizadores (Pobel)
- Jeringas de polipropileno 1 y 2 ml (ICO)
- Lupas binoculares (Zeiss y Meiji EMT)
- Material de disección y sutura
- Microcauterizador
- Microcentrífuga (Heraeus, modelo Biofuge 13)

- Microjeringas de vidrio de 10  $\mu$ l (Hamilton)
- Microscopio (Zeiss)
- Microtomo manual para parafina (Erma)
- Papel de cromatografía (Whatman 3MM)
- pHmetro (Crison, modelo D-501)
- Pipetas automáticas (Gilson y Kartell)
- Placas de cultivo de 24 pocillos (volumen 3 ml) (NUNCCLON)
- Placa térmica (Selecta)
- Sonicador (Sonics and Materials Inc., modelo Vibra Cell)
- Tubos de vidrio con tapón de rosca (Kimax)
- Vórtex (Heidolph)

### **1.3. Material biológico: obtención y mantenimiento.**

#### **1.3.1. LARVAS DE *Rana perezii*.**

##### **a) Fecundación *in vitro***

Hembras sexualmente maduras fueron inyectadas durante el mes de marzo en el saco linfático ventral con un homogeneizado de hipófisis de animales adultos de la misma especie (5-6 hipófisis por hembra). A partir de este momento las hembras se mantuvieron a 20°C hasta la aparición de los primeros huevos en el agua (2-3 días). En este momento, machos sexualmente maduros (con callosidades nupciales bien desarrolladas) fueron sacrificados y los testículos extraídos, los espermatozoides fueron liberados mediante desgarramiento de la pared del testículo en una placa Petri con solución de Ringer para anfibios (CINa 6,5 g, ClK 0,14 g, Cl<sub>2</sub>Ca 0,12 g, CO<sub>3</sub>HNa 0,2 g para 1 l de H<sub>2</sub>O destilada) diluida (1:10), obteniéndose una suspensión de espermatozoides cuya movilidad se comprobó con ayuda de un microscopio. La suspensión de espermatozoides se ajustó a una dilución equivalente a 1 testículo en 5 ml de Ringer diluido.

Los huevos se obtuvieron aplicando un masaje abdominal a las hembras estimuladas, y se depositaron sobre la suspensión de espermatozoides. La fecundación se confirma a los 60 minutos por la rotación de orientación que determina que el polo animal de los huevos

fecundados se sitúe en la parte superior, quedando el polo vegetativo orientado hacia abajo. El porcentaje de fecundación fue superior al 90%.

#### **b) Puesta de huevos espontánea**

Las puestas espontáneas se produjeron en el laboratorio durante la época de reproducción natural para esta especie (Abril-Junio), el porcentaje de huevos fecundados obtenidos fue superior al 90%.

Todas las larvas fueron mantenidas en un fotoperíodo 12L:12D y a una temperatura de  $25 \pm 2^\circ\text{C}$  durante el desarrollo, excepto cuando el diseño experimental requería otras condiciones. La alimentación se realizó *ad libitum* a base de espinacas hervidas. El agua, desclorada con antelación, se renovaba diariamente.

Las larvas utilizadas en todos los experimentos procedían de puestas espontáneas, excepto las correspondientes a los primeros estados del estudio ontogénico de los ciclos diarios de HT.

En la presente memoria se han utilizado las tablas de desarrollo de Taylor y Kollros (1946) que describen el desarrollo en *Rana pipiens* y la tabla de Gosner (1960) que se elaborada para poder ser aplicada a todas las especies de anuros, por lo que facilita la comparación de resultados, para la determinación de los estados de desarrollo de las larvas empleadas en los distintos diseños experimentales. La notación se realizará de la siguiente forma: para los estados de Gosner se utilizarán números arábigos seguidos de la letra G, en el caso de los estados de Taylor y Kollros se usarán números romanos seguidos de las letras TK.

#### **1.3.1. ANIMALES ADULTOS DE *Rana perezi*.**

La alimentación se realizó de dos formas distintas, alimentación forzada a base de hígado de pollo, o alimentación *ad libitum* con larvas de dípteros (*Calliphora*). El tipo de dieta y la frecuencia de alimentación dependía de la época del año y del diseño experimental utilizado para cada trabajo y tenía como finalidad mantener constante el peso de los animales durante los distintos estudios.

## **2. MÉTODOS.**

### **2.1. Obtención de muestras.**

#### **2.1.1. EMBRIONES Y LARVAS.**

En todos los casos los animales enteros se congelaron a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta la posterior valoración hormonal. En el caso de las larvas, normalmente fueron sacrificadas con un exceso (0,1%) de anestésico (MS-222, tricainmetanosulfonato), excepto en los casos del estudio ontogénico y del efecto del CRF, en los que se sacrificaron por congelación instantánea en hielo seco.

#### **2.1.2. EXTRACCIÓN DE SANGRE Y ÓRGANOS DE INDIVIDUOS ADULTOS.**

Una vez desmedulado el animal, se procedió a su disección para dejar al descubierto el corazón. Una vez liberado éste y tras rasgar el pericardio se introdujo un capilar heparinizado por el ápice ventricular (*conus arteriosus*), recogiendo la sangre en tubos eppendorfs previamente heparinizados que se mantenían en frío. Las muestras de plasma se obtuvieron mediante centrifugación a 3.000 rpm (1.300 g) durante 10 minutos ( $4^{\circ}\text{C}$ ) y se mantuvieron congeladas a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la valoración hormonal.

Tras la extracción de sangre, se extirparon distintos órganos dependiendo de los diseños experimentales (véase apartado 2.8.) y se determinó su peso húmedo con el objeto de calcular posteriormente los respectivos índices organosomáticos (peso del órgano en g/100 g de peso corporal).

Para la extirpación del tiroides se cortó la mandíbula inferior por debajo del esternón y se situó en posición ventral, a continuación tras cortar longitudinalmente la piel se retiró el esternón y se rasgó el músculo esternohioideo hasta dejar al descubierto el cartílago hioideo al que se encuentra unido el tiroides. Por último, con la ayuda de una lupa binocular se extirparon las glándulas junto con una pequeña porción del cartílago hioideo y se conservaron a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la valoración de HT.

## 2.2. Técnicas quirúrgicas.

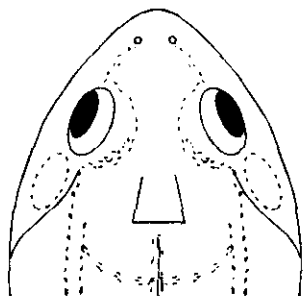
Antes de ser sometidos a cualquier intervención quirúrgica, los animales adultos fueron anestesiados con MS-222 (1,5 g/l) disuelto en agua desclorada en la que se sumergía al animal durante 10-15 minutos. Este tipo de anestésico es muy utilizado debido a la facilidad de administración, ya que la solución pasa rápidamente a través de la vascularizada piel de los anfibios, y a que el grado de anestesia es fácilmente regulable. Además, posee una escasa toxicidad dentro del rango de concentraciones utilizado.

### 2.2.1. OVARIECTOMÍA.

Una vez situado el animal en posición ventral, se cortó primero la piel y a continuación la capa muscular subyacente, realizando una pequeña abertura longitudinal situada lateralmente a través de la cual se introducían cuidadosamente una pinzas finas y se extraían los ovarios embebidos en el estroma del tejido conjuntivo que finalmente se diseccionaba asegurándose de no dejar ningún resto de ovario en el interior del animal. Por último, se colocaba una lámina de espongostan, antihemorrágico y hemostático reabsorbible, y se procedía a la sutura de músculo y piel por separado. La recuperación del animal se producía en pocos minutos, en agua libre de anestésico, evitando humedecer la herida. En el caso de los animales controles, se realizó una falsa ovariectomía que consistía en extirpar sólo una pequeña porción del ovario derecho. Al final del período experimental se comprobaba el éxito de la operación, mediante disección y verificación de que no quedaban restos de ovarios.

### 2.2.2. PINEALECTOMÍA.

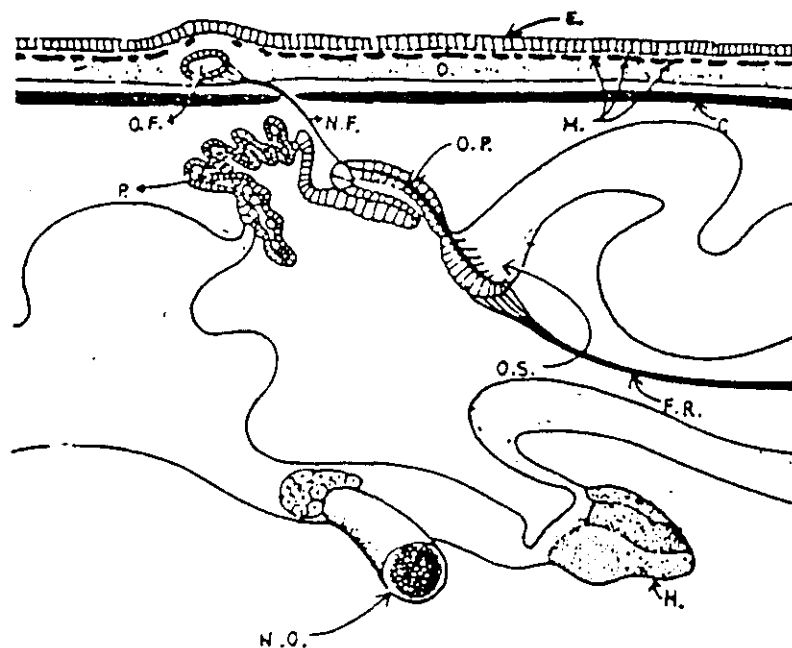
Con el animal anestesiado y en posición dorsal se procedió a realizar un corte de forma trapezoidal (Esquema 1) en la piel de la cabeza por detrás de los ojos cortando a



**Esquema 1.** Corte realizado en la piel craneal de un individuo de *Rana perezi* que va a ser sometido a pinealectomía.

continuación el nervio frontal que conecta el órgano frontal extracraneal con el órgano pineal intracraneal (véase Esquema 2). Posteriormente, con una hoja de bisturí se hace una pequeña incisión transversal en la línea media del cráneo y localizada posteriormente al mesencéfalo, a partir de la cual, con la ayuda de una tijeras finas, se abre una ventana de la misma forma que la realizada en la piel. Esta solapa ósea se dobla hacia la parte anterior dejando al descubierto el techo diencefálico. Bajo una lupa binocular se localiza la glándula pineal en la línea media del diencefalo, anterior a la paráfisis, como una estructura alargada con abundante irrigación y carente de melanóforos, procediéndose a su destrucción con un microcauterizador. A continuación se coloca la solapa craneal en su posición original, se sitúa sobre ella una lámina fina de espongotan y se sutura la piel. En los animales controles (falsos pinealectomizados) se realizaban incisiones similares pero no se seccionaba el nervio frontal ni se cauterizó la pineal.

Al final del período experimental se extrajeron los cerebros que fueron fijados en formol (10%) y posteriormente observados a la lupa binocular para verificar el éxito de la operación.



**Esquema 2.** Corte sagital del encéfalo de *Rana* (Adler, 1976). C, cráneo; D, dermis; E, epidermis; F.R., fibras de Reissner; H, hipófisis; M, melanóforos; N.F., nervio frontal; N.O., nervio óptico; O.F., órgano frontal; O.P., órgano parietal; O.S., órgano subcomisural; P, paráfisis.

### 2.2.3. CEGUERA.

Una vez anestesiado el animal y con el fin de evitar que los globos oculares descieran hacia la cavidad bucal, se introducía el extremo del dedo índice en la boca presionando el paladar hacia arriba. Posteriormente se separó la córnea con una tijeras de iridectomía permitiendo la salida del cristalino y de los humores oculares. A continuación se limpia el interior de la cavidad ocular con algodón eliminando cualquier resto de retina, de modo que sólo quede la copa óptica. Por último, se cauteriza la salida del nervio óptico para evitar hemorragias, se llena la copa óptica con hemostático en polvo y se cubre con una capa de espongostan.

## 2.3. Técnicas de microinyección.

### a) Soluciones.

- Solución Holtfreter concentrada (conservación a 4°C).

ClNa	0,35 g/100 ml
ClK	0,05 g/100 ml
Cl <sub>2</sub> Ca	0,01 g/100 ml
CO <sub>3</sub> HNa	0,02 g/100 ml

Las hormonas (hCRF y oCRF) se disolvieron directamente en una solución de Holtfreter al 10% preparada en el momento de la inyección. Las concentraciones finales fueron las siguientes: 0,5 y 1 µg de hCRF/2 µl de Holtfreter; 1 y 2 µg oCRF/2 µl de Holtfreter.

### b) Protocolo.

Tras anestesiarse a las larvas con MS-222 diluido (1:10.000) en agua desclorada, se colocaban en un molde de parafina escavado con una forma similar a la del animal para facilitar la inmovilización de las larvas. A continuación se coloca la larva en posición lateral de modo que la abertura opercular quede visible. Las inyecciones se llevaron a cabo utilizando una microjeringa Hamilton de 10 µl a la que se le adaptaba, a través de una cánula, un tubo capilar fino que hacía las veces de microaguja. Las microagujas se fabricaban estirando capilares de vidrio a la llama de un mechero Bunsen, comprobando posteriormente



con la ayuda de una lupa binocular la apertura del extremo. El sistema se cebaba con agua destilada para evitar la contaminación de la microjeringa con la sustancia a inyectar (CRF o Holtfreter 10%). El volumen de inyección era de 2  $\mu$ l y se inyectaba a través de la abertura opercular dirigiendo la microaguja hacia la zona ocular posterior con el objeto de que la sustancia inyectada se depositase lo más cerca posible del sistema nervioso central. Las larvas recuperaban su actividad normal en agua desclorada libre de anestésico en un período de 5-10 min.

## **2.4. Técnicas histológicas.**

### **a) Fijación e inclusión.**

Se llevó a cabo la fijación del tejido (la cabeza completa de las larvas) durante 8-10 días en formol al 10% (pH 7,2) que fue neutralizado con NaOH. A continuación, se pasaron los tejidos por la serie ascendente de alcoholes: etanol 40°, 60° (un baño de 10 min), 80° (un baño de 20 min), 96° (un baño de 30 min y otro de 60 min) y 100° (2 baños de 60 min cada uno). A continuación se eliminaron los restos de alcohol con papel de filtro y se pasaron los tejidos por tolueno (dos baños de 1 min cada uno), realizándose por último la inclusión en parafina (punto de fusión 58-60°C) durante 24 horas.

### **b) Cortes y tinción.**

Se realizaron cortes transversales de 5  $\mu$ m de espesor utilizando un microtomo para microscopía óptica. Los cortes seriados de cada muestra se montaron secuencialmente en portas desengrasados y previamente tratados con albúmina-glicerina (1:2, p/v) y se secaron en una estufa a 35°C durante al menos 48 horas. Tras el desparafinado en xilol (90 min), los cortes se pasaron por la serie descendente de alcoholes (8 min en etanol 100°, 8 min en etanol 96°, 10 min en etanol 50° y 5 min en agua destilada), tiñéndose a continuación con hematoxilina de Groat (5 min) y eosina (30 s). Por último, los cortes se deshidrataron (etanol 96°, 100°, xilol-etanol 100° y xilol, un baño de 2 min cada uno) y se montaron con DePex.

### **c) Medidas morfométricas.**

Con el objeto de determinar si se produjeron alteraciones morfológicas de la glándula que pudieran reflejar modificaciones de la actividad tiroidea tras el tratamiento con CRF

(véase apartado 2.8.1.), se llevaron a cabo tres medidas morfométricas de la glándula derecha (30 cortes/larva):

- **Diámetro folicular ( $\mu\text{m}$ ):** Se midió siempre el diámetro interior máximo del folículo mayor de cada corte.
- **Altura del epitelio folicular ( $\mu\text{m}$ ):** Se medía la altura del epitelio de un folículo elegido al azar en cada corte.
- **Número de folículos.**

La  $\bar{x}$  y el e. de cada tratamiento se calculó a partir de las medias de los animales en ese grupo.

## 2.5. Técnicas enzimático-colorimétricas.

### 2.5.1. VALORACIÓN DE GLUCOSA.

Los niveles de glucosa en plasma se determinaron por el método de la glucosa oxidasa (GOD), utilizando un kit comercial suministrado por los laboratorios Knickerbocker (Cromatest Glucosa) y cuyo fundamento teórico es el siguiente:

La GOD cataliza la oxidación de glucosa a ácido glucónico. El peróxido de hidrógeno producido se detecta mediante un aceptor cromogénico de oxígeno, fenol-ampirona, en presencia de peroxidasa (POD). La quinona roja formada es proporcional a la concentración de glucosa en la muestra ensayada (Trinder, 1969).

#### a) Reactivos.

##### - Mezcla enzimática

Tampón fosfato, pH 7,5	100	mM
Ampirona	0,8	mM
GOD	$\geq 6.000$	U/l
POD	$\geq 1.000$	U/l

##### - Fenol

5 mM

##### - Patrón glucosa-urea

Glucosa	1	mg/ml
Urea	0,5	mg/ml

**b) Protocolo.**

- Preparación del reactivo de trabajo mediante la mezcla de volúmenes iguales de mezcla enzimática y fenol.
- Preparación de la curva patrón (0,25, 0,50, 0,75, 1 y 2 mg/ml).
- Se pipetea 20  $\mu$ l de plasma en los tubos problema y 20  $\mu$ l de cada una de las concentraciones anteriormente citadas en el caso de la curva patrón.
- Se añade a todos los tubos 2,5 ml de reactivo de trabajo. Se prepara también un blanco que lleva únicamente el reactivo de trabajo y 20  $\mu$ l de agua destilada.
- Agitación con Vórtex e incubación durante 10 min a 37°C.
- Tras ajuste del colorímetro con el blanco, se mide la absorbancia a 505 nm.
- Las determinaciones se llevaron a cabo por duplicado y los datos se expresaron en mg/100 ml.

**2.6. Técnicas de cultivo estático *in vitro*.****e) Preparación del medio de cultivo.**

- DMEM ("Dulbecco's modified Eagle's medium")	6,6 g/l
- HEPES (7,5 mM)	1,785 g/l
- Albúmina sérica bovina	0,75 g/l
- NaHCO <sub>3</sub> (35 mM)	2,94 g/l
- Gentamicina	50 mg/l
- Tween 80	3 gotas

Después de la disolución completa de los componentes en agua bidestilada, el medio se satura con carbógeno (95% O<sub>2</sub>: 5% CO<sub>2</sub>). Ajustar el pH a 7,4 con NaOH 0,1 N.

**f) Procedimiento general del cultivo.****- Tiroides.**

Tras la disección del tiroides, siguiendo el método explicado en la sección 2.1.1, se sometieron a un lavado con medio de cultivo (10 ml/par de glándulas) durante 12 h (4°C) en placas Petri, con el objeto de evitar la influencia de posibles traumas asociados a la disección

del órgano. Finalizado este período los tiroides fueron trasladados a placas de cultivo estériles de 24 pocillos colocándose el tiroides de una rana como control y el otro tiroides del mismo animal como experimental y fueron preincubados durante dos horas en un volumen de 1 ml de medio de cultivo para conocer los niveles basales de producción de HT. A continuación, tras recoger los medios procedentes de la preincubación, se inició el cultivo propiamente dicho que duró 12 horas, añadiendo 0,5 ml de medio de cultivo/pocillo. Las placas de cultivo se colocaron en cámaras transparentes herméticamente cerradas que se saturaron con carbógeno. Tanto la preincubación como la incubación se realizaron a una temperatura de  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$ , introduciendo las cámaras herméticas en un baño termostatzado y con una agitación del 10%.

Los cambios de medio se realizaron rutinariamente cada 3 horas, las alícuotas resultantes de 0,5 ml del medio se congelaron a  $-25^\circ\text{C}$  hasta el momento del ensayo de HT.

- Preparación de los tratamientos hormonales:

Se utilizó una solución de  $E_2$  obtenida a partir de una solución concentrada (1mM) en etanol absoluto preparada el mismo día del experimento, añadiéndose una alícuota (25  $\mu\text{l}$ ) al medio de cultivo para conseguir la concentración final deseada en el medio (1  $\mu\text{M}$ ), de modo que el porcentaje final de etanol era del 0,1%. En los medios de los grupos control se añadió una cantidad igual de etanol para igualar el porcentaje final del mismo en todos los grupos.

- **Ovocitos.**

El procedimiento para el cultivo de ovocitos de *R. perezii* ya ha sido previamente descrito (Gancedo *et al.*, 1991b). Brevemente, los ovarios procedentes de una rana utilizada en el experimento de ovariectomías (véase apartado 2.8.1.), se situaban en placas Petri conteniendo Ringer de anfibios diluido al 10%, dónde permanecían durante media hora, agitando ligeramente cada cierto tiempo, a fin de conseguir un lavado adecuado. Seguidamente, y con objeto de que las hormonas puedan actuar en toda la superficie de los ovocitos, estos fueron separados unos de otros con suavidad, utilizando pinzas de relojero y con la ayuda de una lupa binocular, sin dañar la capa de células foliculares que los rodea. Los ovocitos (10/pocillo) se colocaban a continuación en multiplacas estériles de 24 pocillos con 1 ml de medio de cultivo en cada uno.

Una vez situados los ovocitos en los pocillos, las placas se colocaron en cámaras transparentes herméticamente cerradas que se saturaron con carbógeno. La incubación se

realizó a una temperatura de  $25 \pm 0,1^{\circ}\text{C}$ , introduciendo las cámaras herméticas en un baño termostatzado y con una agitación del 10%.

La duración total del cultivo fue de 12 h y los cambios de medio se realizaron rutinariamente cada 3 horas. Las alícuotas de medio resultantes (1 ml) se congelaron a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento del ensayo de las hormonas esteroides.

- Preparación de los tratamientos hormonales:

La solución de hipófisis se obtuvo mediante la sonicación de 25 hipófisis procedentes de individuos adultos de *R. perezii* en Ringer de anfibios (1 ml), que se llevó posteriormente al volumen adecuado de medio de cultivo para conseguir la concentración final deseada en el medio (0,5 equ. de hipófisis/ml). La proporción final de Ringer en el medio fue de un 2%.

La GCH se disolvió directamente en el medio de cultivo hasta la concentración final deseada (50 UI/ml).

La solución de  $T_3$  se obtuvo a partir de una solución concentrada (0,03 mM) en NaOH 0,05 N que se diluyó sucesivamente en  $H_2O$  bidestilada hasta conseguir una alícuota (325,5  $\mu\text{l}$ ) que se añadía al medio de cultivo para conseguir la concentración final deseada (10 pM). La proporción final de NaOH fue despreciable (0,0000001%) y la de  $H_2O$  fue de un 0,3%.

En los medios de los grupos control se añadió una cantidad igual de cada disolvente para igualar la concentración final del mismo en todos los grupos de cada experimento.

## 2.7. Técnicas radioinmunológicas.

### a) Principio del ensayo.

El radioinmunoensayo (RIA) se basa en la reacción de inhibición competitiva que se establece, entre una cantidad fija y conocida de un antígeno marcado radiactivamente y un nivel variable de antígeno sin marcar o nativo, por la unión a un anticuerpo específico. El ensayo se lleva a cabo permitiendo la incubación de una mezcla del antígeno nativo y marcado en presencia de un anticuerpo apropiado hasta que se establece un equilibrio químico entre las formas unidas y libre del antígeno. La concentración de antígeno marcado y del anticuerpo se mantienen constantes, de forma que existe una relación entre la concentración de antígeno nativo y la proporción del marcador desplazada del complejo antígeno-anticuerpo, una vez alcanzado el equilibrio tras la incubación. Esta característica permite estimar

concentraciones desconocidas del antígeno (hormona) en una muestra comparando la cantidad del marcador unido al anticuerpo con una curva estándar hecha con concentraciones conocidas de hormona.

A continuación es necesario separar las fracciones libre y unida del marcador, para lo cual existen varios métodos, que suelen constituir la principal diferencia entre los distintos protocolos de RIA. Las técnicas más usadas son las siguientes:

- Métodos de migración diferencial, como electroforesis, cromatografía de filtración y cromatoelectroforesis. Una desventaja de estas técnicas es que requieren mucho tiempo.

- Separación por adsorción. Se utiliza una mezcla de partículas de carbón activado y dextrano, sílice o talco, de manera que el marcador libre se une a dichas partículas debido a su bajo peso molecular, y los complejos antígeno-anticuerpo permanecen solubles, con lo que la radiactividad remanente se cuantifica en el sobrenadante. Este método se utiliza con marcadores emisores de radiación  $\beta$  ( $^3\text{H}$ ,  $^{14}\text{C}$ ). Un punto crítico de estas técnicas es la constancia en el tiempo de incubación necesaria para obtener resultados reproducibles.

- Separación por precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo. Dicha precipitación se suele conseguir con el uso de un 2º anticuerpo contra las inmunoglobulinas de la especie animal productora del primer anticuerpo. La radiactividad se mide en el precipitado (fracción unida). Este método se utiliza generalmente cuando el marcador emite radiación  $\gamma$  ( $^{125}\text{I}$ ,  $^{131}\text{I}$ ) y fue el utilizado en los RIAs realizados en esta Memoria. También se puede conseguir la precipitación de los complejos utilizando solventes orgánicos como dioxano y sales como el sulfato amónico.

- Inmunoensayos de fase sólida. En este caso se acopla el anticuerpo a un soporte sólido, normalmente tubos de polipropileno, y tras la incubación con el antígeno se decanta el que ha quedado libre y se mide la radiactividad presente en el soporte.

#### **b) Cálculo de resultados.**

Para la realización del RIA, además de la curva estándar, deben incluirse los siguientes tubos controles:

- Cuentas totales (T). Contienen únicamente la cantidad total de marcador añadido a todos los tubos.
- Unión máxima ( $B_0$ ). Dichos tubos no tienen hormona nativa o fría, representando la unión máxima del marcador al anticuerpo (el volumen de la muestra se sustituye

por un volumen equivalente de tampón del RIA o del estándar 0, que es lo que en realidad representa, en el caso de los RIAs comerciales, para mantener constante el volumen final de reacción).

- Unión inespecífica (NSB). En este tubo no existe anticuerpo, define la unión no específica del marcador al tubo de ensayo (el volumen del anticuerpo se sustituye por un volumen equivalente de tampón del RIA, o del estándar 0 en el caso de los kits comerciales, para mantener constante el volumen de reacción).

A partir de estos tubos y de los obtenidos de la curva estándar se realizan los siguientes cálculos:

$$\text{Capacidad de unión (\%)} = (\text{Bo} - \text{NSB}) / \text{T} \times 100$$

$$\text{Unión inespecífica (\%)} = \text{NSB} / \text{T} \times 100$$

Unión para estándares y muestras (Y):

$$\text{Y (\%)} = [\text{muestra(cpm)} - \text{NSB}] / [\text{Bo(cpm)} - \text{NSB}] \times 100$$

La representación gráfica de la curva estándar puede realizarse de las siguientes formas:

- Y frente a [H] (lineal-lineal). Da lugar a una curva de perfil hiperbólico, tiene la ventaja de que los datos representados no sufren ninguna transformación, evitándose así los errores asociados a la misma.
- Y frente a log[H] (lineal-logarítmica). La curva resultante tiene un perfil sigmoideo, se aprecia con claridad el intervalo de la curva con mayor precisión, que corresponde al tramo de mayor pendiente.
- Logit(Y) frente a log[H] (logit-logarítmica). La transformación logística de Y da lugar a líneas rectas.

$$\text{Logit(Y)} = \log(\text{Y}/(100 - \text{Y}))$$

Simplifica el análisis matemático, pero tiene el inconveniente de que la doble transformación conlleva errores importantes en la estimación de los resultados.

El cálculo de las concentraciones de las muestras se puede realizar utilizando varios métodos:

- **Método de regresión lineal.** Los datos de la curva estándar son transformados aplicando la transformación logística a la unión específica y la logarítmica a las concentraciones, se consigue pues la linealización de la curva estándar, permitiendo el uso del método de los

mínimos cuadrados para obtener la regresión lineal. Este método sólo produce resultados aceptables cuando las muestras entran en la parte central de la curva (Y situado entre 10 % y 90 % del Bo).

- **Función hiperbólica.** A partir de la ecuación general de una curva hiperbólica y utilizando métodos de regresión no lineal se ajusta la curva de este tipo a los puntos estándares.

- **Métodos de interpolación.** Estos métodos no están basados en modelos matemáticos concretos. Se conectan los puntos estándares consecutivos mediante segmentos de funciones matemáticas, que pueden ser líneas rectas o curvas de 2º ó 3º grado.

El método utilizado en la presente Memoria se basa en un método de interpolación utilizando segmentos de curvas de 3º grado, estos segmentos son unidos para obtener una curva continua con un mínimo de oscilaciones, para conseguirlo el proceso es repetido varias veces por cálculo iterativo asistido por ordenador.

c) **Criterios de validez del RIA.** (Midgley *et al.*, 1969).

Los criterios de validez que debe cumplir un RIA son los siguientes:

- **Especificidad.** Es la capacidad del anticuerpo para discernir selectivamente entre varios compuestos químicamente relacionados con la hormona a valorar, y que podrían existir en las muestras biológicas. Se calcula como los coeficientes de reacción cruzada, que representan la relación en tanto por ciento entre las concentraciones de hormona y el compuesto similar necesarios para obtener un desplazamiento del 50% de una cantidad conocida de marcador.

- **Paralelismo.** Entre la curva estándar y una serie de diluciones de una muestra. Este método de validación es utilizado como un índice de la similitud de la inmunoreactividad entre el compuesto estándar y el valorado en la muestra. La existencia de paralelismo indica que el factor de dilución utilizado no afecta a la estimación de la concentración final de hormona.



- **Recuperación.** Se define como la diferencia en tanto por ciento entre el valor estimado mediante RIA y la cantidad real de hormona añadida. En el caso de que se realice utilizando varias concentraciones de hormona, debe establecerse una correlación lineal entre la cantidad real y la estimada.

- **Sensibilidad.** Se define como la menor concentración de hormona que puede ser discriminada de la unión máxima ( $B_0$ ) con una  $p < 0,05$ . La sensibilidad se calcula como el punto que dista del  $B_0$  en 2 veces su desviación estándar.

- **Precisión y reproductibilidad.** Se mide por medio de los coeficientes de variación (desviación típica/media %) intra- e interensayo, determinados a varias concentraciones de la curva estándar. Dichos parámetros muestran la reproductibilidad del método bajo las condiciones del ensayo utilizadas. Dichos coeficientes deben ser siempre inferiores a la variabilidad encontrada en las muestras biológicas.

#### **2.7.1. RIAs DE HORMONAS TIROIDEAS.**

Los RIAs de HT de gran sensibilidad y especificidad se basan en los descritos por Weeke y Ørskov (1978) y posteriormente modificados por Obregón y colaboradores (1979).

Los trazadores internos utilizados en el proceso de extracción y los utilizados como antígenos en los RIAs fueron cedidos amablemente por la Dra. Gabriella Morreale de Escobar (Unidad de Endocrinología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid) y fueron sintetizados en su laboratorio por el método de la cloramina T a partir de yodotironinas de un grado menor de yodación (3,5- $T_2$ ) consiguiéndose una actividad específica ( $3.000 \mu\text{Ci}/\mu\text{g}$ ) superior a la de los productos comerciales disponibles, lo que resulta esencial para conseguir la alta sensibilidad de los RIAs necesaria para la valoración de HT en muestras de anfibios.

Previamente a la realización de los RIAs se llevó a cabo un proceso de extracción, con el objeto de concentrar y purificar las HT en algunas muestras (plasma y larvas). En el caso del tiroides el proceso seguido fue diferente (véase apartado 2.7.1.b). En los cultivos de tiroides se llevó a cabo la valoración de HT de forma directa en el medio.

a) Método de extracción de hormonas tiroideas.- **Tampones de extracción.**

Los tampones se obtienen a partir de dos soluciones (A y B) preparadas en agua bidestilada:

Solución A:	Ácido acético glacial	11,5 ml/l
Solución B:	Acetato sódico anhidro	16,4 g/l

Solución:	A	B
- Tampón acetato pH 7:	1,25 ml	1 l
- Tampón acetato pH 4:	1 l	180 ml
- Tampón acetato pH 3:	1 l	10 ml

Los pH se ajustan con NaOH o ácido acético según el caso.

- **Protocolo.**

- Homogeneizar la muestra (larvas) en metanol (3-4 ml/g tejido) utilizando homogeneizadores tipo Potter-Elvehjem (teflón-vidrio) acoplados a un rotor automático (2.900 rpm).
- Transferir los homogeneizados a tubos de vidrio con tapón de rosca y añadir como trazadores internos, 1.000-1.500 cpm de [ $^{125}\text{I}$ ]T<sub>3</sub> y 1.500-2.000 cpm de [ $^{131}\text{I}$ ]T<sub>4</sub> de alta actividad específica y conteniendo menos de 1-2 pg de T<sub>3</sub> o T<sub>4</sub>, en 100  $\mu\text{l}$  de metanol, con el objeto de calcular la recuperación individual de las yodotironinas para cada muestra.
- Añadir cloroformo en un volumen equivalente al doble de la cantidad absoluta de metanol que contiene el homogeneizado.
- Centrifugar 15 min a 2000 rpm (800 g).
- Añadir al precipitado un volumen (4,5-6 ml/g tejido) de una mezcla de cloroformo-metanol en una proporción 2:1 (v/v). En el caso del plasma se añade directamente el volumen apropiado de esta mezcla, de forma que el volumen final del extracto sea de unas 20 veces el volumen de plasma utilizado (Folch *et al.*, 1957; Gordon *et al.*, 1982).

- Centrifugar 15 min a 2.000 rpm (800 g).
- Juntar los sobrenadantes (extracto cloroformo-metanol) e igualar los volúmenes con la mezcla cloroformo-metanol en todos los tubos hasta conseguir un volumen final de unas 20 veces el peso de tejido utilizado (Folch *et al.*, 1957; Gordon *et al.*, 1982).
- Añadir  $\text{Cl}_2\text{Ca}$  0,05 % (p/v) en una cantidad de acuerdo con la siguiente relación:  $1/4 (V_f - A \times B) - A \times B$ , donde  $V_f$  representa el volumen final del extracto, A es un coeficiente que refleja el porcentaje de agua del tejido, aproximadamente 0,8 en las larvas y 1 para el plasma, y B el peso o volumen de muestra. Con este paso conseguimos extraer las yodotironinas en una fase acuosa (Gordon *et al.*, 1982).
- Agitación con Vórtex y separación de las fases durante toda la noche en frío ( $4^\circ\text{C}$ ).
- Repetir la extracción añadiéndole a la fase inferior una mezcla de cloroformo-metanol- $\text{Cl}_2\text{Ca}$  en la proporción 3:49:48 (v/v/v).
- Concentración y purificación de las yodotironinas mediante el paso del extracto acuoso (fases superiores) a través de columnas que contenían 1 ml de resina de intercambio aniónico Dowex AG 1x2 (Mallol *et al.*, 1982; Morreale de Escobar *et al.*, 1985).

Las columnas fueron confeccionadas utilizando jeringas de polipropileno de 2 ml sin émbolo, situando a continuación un círculo de papel de cromatografía Whatmann en el fondo. Previamente a su utilización el Dowex era tratado durante al menos 12 horas con ácido acético al 70%, procediéndose posteriormente a su lavado con agua destilada. Finalmente, se ajustaban las columnas a pH 7 mediante lavados con tampón acetato pH 7.

- Una vez pasada la muestra, se procedía al lavado de las columnas siguiendo el siguiente esquema:
  - 2 ml de buffer acetato pH 7
  - 2 ml de etanol absoluto
  - 2 ml de buffer acetato pH 7
  - 2 ml de buffer acetato pH 4
  - 2 ml de buffer acetato pH 3
  - 2 ml de ácido acético al 1 %
  - 2 ml de ácido acético al 35 %

- Eluir las yodotironinas, que quedan retenidas en las columnas en 5 fracciones, de 0,5 ml cada una, con ácido acético al 70%.
- Cuantificar la radiactividad ( $^{125}\text{I}$  y  $^{131}\text{I}$ ) de las fracciones en un contador  $\gamma$  y unir las 2-3 fracciones que contenían la mayor parte de los trazadores internos.
- Evaporar a sequedad (50°C, 5-6 h) en un rotavapor (Gyro Vap) bajo condiciones de vacío.
- Reconstituir las muestras en 300  $\mu\text{l}$  del tampón A del RIA (véase apartado c) más adelante) que se conservan a -25°C hasta el momento de la valoración de HT.

El conteo de las fracciones con los trazadores debe hacerse con exactitud, ya que es empleado posteriormente para los cálculos de la recuperación individual de cada hormona, que se utilizarán para la corrección de las concentraciones obtenidas en los RIAs. Para realizar los citados cálculos de recuperación se introducían en cada ensayo ocho tubos estándares de conteo, cuatro conteniendo la cantidad total de trazador añadida a las muestras ( $[^{125}\text{I}]\text{T}_3 + [^{131}\text{I}]\text{T}_4$ ) y cuatro sólo con  $[^{131}\text{I}]\text{T}_4$  para calcular la interferencia del  $^{131}\text{I}$  en el canal de conteo del  $^{125}\text{I}$ . También se incluían dos blancos que seguían el mismo proceso que las muestras y que se utilizaron para la corrección de los datos cuando fue necesario. Los porcentajes de recuperación normalmente fueron del orden de 60-85 % para  $\text{T}_3$  y 50-70 % para  $\text{T}_4$ . La  $[^{131}\text{I}]\text{T}_4$  se utilizó durante un período no superior a un mes a partir del marcaje para evitar la adición de  $\text{T}_4$  a las muestras, dada la menor vida media de este isótopo en relación a la del  $^{125}\text{I}$  (unos 4 meses). La pureza radioquímica de los trazadores internos fue del 99 %, conservándose una buena estabilidad en etanol al 50 %, y se comprobó por TLC inmediatamente antes de su uso (Morreale de Escobar *et al.*, 1985).

#### **b) Procesamiento del tiroides.**

##### **- Reactivos.**

- Tampón Tris-ClH, 0,2 M, pH 8,6
  - Tris-ClH                      0,884 g
  - Tris                              1,744 g
  - Metimazol                    0,285 g

En primer lugar se disuelven el Tris y el metimazol en una cantidad pequeña de agua bidestilada y a continuación se añade el Tris-ClH, se disuelve y se enrasa a 100 ml. Duración: 20 días a 4°C.

- Pronasa E al 0,58% (p/v), con una actividad de 4,6 U/mg, en el tampón Tris-ClH. Preparación en el momento del ensayo.

**- Protocolo.**

- Sonicar las glándulas tiroideas en 500  $\mu$ l de metanol 3 veces durante 10 segundos cada vez, al 70% de la potencia de salida a 50 W.
- Centrifugar durante 15 min a 4.000 rpm (2.150 g) y 4°C.
- Evaporar el sobrenadante y reconstituir la muestra en 500  $\mu$ l de tampón A del RIA y conservar a -25°C. Las HT así extraídas representan el contenido libre de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> (Morreale de Escobar *et al.*, 1988).
- Secar el precipitado al aire. Digestión proteolítica con Pronasa E 0,58% (150  $\mu$ l) durante 12 horas a 37°C, para romper los enlaces covalentes que mantienen unidas las HT a la Tg (Rolland *et al.*, 1970).
- Añadir 1 ml de metanol frío para parar la reacción.
- Centrifugación (15 min, 2.150 g, 4°C).
- Evaporar el sobrenadante a alta temperatura (60°C) para evitar posibles interferencias debidas a restos de la actividad proteolítica en las muestras (Obregón *et al.*, 1991).
- Reconstituir las muestras en 1 ml de tampón A del RIA y conservar a -25°C hasta el momento de la valoración radioinmunológica. Esta fracción representa los residuos intratiroides de yodotironinas incorporadas a la Tg (Morreale de Escobar *et al.*, 1988) y lo designaremos como el contenido de HT unidas.

En este caso también se hicieron cuatro blancos de extracción y digestión que fueron sometidos exactamente al mismo proceso que las muestras, siendo utilizados para la corrección de los resultados cuando fue necesario.

**c) Tampones de los RIAs.**

- **Tampón A:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8, BSA 0,2%. Para 1 l de agua bidestilada.

- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2940 g
- $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,7520 g
- Mertiolato	0,2429 g
- BSA 22 %	10 ml

- **Tampón C:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8. Para 1 l de agua bidestilada.

- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2940 g
- $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,7520 g
- Mertiolato	0,2429 g

- **Tampón F:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8, BSA 0,05%. Para 1 l de agua bidestilada.

- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2940 g
- $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,7520 g
- Mertiolato	0,2429 g
- BSA 22 %	2,5 ml

- **Tampón G:** Tampón fosfato 0,04 M, pH 8, BSA 0,05% con cisteína. Para 1 l de agua bidestilada.

- $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot \text{H}_2\text{O}$	0,2940 g
- $\text{PO}_4\text{HNa}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	6,7520 g
- Mertiolato	0,2429 g
- BSA 22 %	2,5 ml
- Cisteína	100 mg

El pH se ajustó con NaOH o ácido ortofosfórico según el caso.

**2.7.1.1. RIA de triyodotironina.****a) Reactivos.**

- **Curva estándar.**

- Se pesan 5 mg de  $\text{T}_3$  y se disuelven en 250 ml de NaOH 0,05 N. La concentración será de 20  $\mu\text{g/ml}$  (esta solución se puede conservar hasta 2 meses a 4°C).

- Se toman 25  $\mu$ l y se ajustan a 100 ml con tampón A. La concentración será de 5 ng/ml (esta solución patrón se conserva un máximo de dos semanas a 4°C).

- A partir de la solución patrón, y en el momento del ensayo, se hacen diluciones sucesivas con tampón A hasta conseguir las siguientes concentraciones de  $T_3$  en un volumen final de 10  $\mu$ l: 0,78, 1,56, 3,12, 6,25, 12,5, 25 y 50 pg de  $T_3$ .

**- Anticuerpos.**

Tanto el anticuerpo anti- $T_3$  como el anticuerpo anti- $T_4$  fueron cedidos amablemente por la Dra. M.J. Obregón (Unidad de Endocrinología Molecular, Instituto de Investigaciones Biomédicas, CSIC y Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid). La especificidad del anticuerpo anti- $T_3$  ha sido previamente caracterizada (Ruiz de Oña *et al.*, 1991) obteniéndose las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
$T_3$	100
$T_4$	1,1
3',3- $T_2$	0,9
3,5- $T_2$	0,7
Tetrac	0,5
r $T_3$	0,0016

En el caso del anticuerpo anti- $T_3$  se hizo una dilución 1:500 (dilución "stock") que se dividió en alícuotas para 100 y 200 tubos de RIA que se mantenían congeladas a -25°C. A partir del "stock" se hacía una dilución 1:150, con tampón A, en el momento de realizar el RIA.

Como reactivo precipitante se utilizó una mezcla (2:1) de polietilenglicol (PEG) al 30% (p/v) preparado en tampón C (1 ml/tubo) y suero de ternera diluido (1:6,66) con tampón C (0,5 ml/tubo).

**b) Protocolo.**

- Se pipetea 10  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la curva estándar y 60  $\mu$ l de muestra (las diluciones finales para la determinación de las fracciones libre (F) y unida (B) de  $T_3$  tiroidea fueron 1:25 y 1:5.000, respectivamente).
- Igualar el  $V_f$  en todos los tubos con tampón A hasta un máximo de 60  $\mu$ l.
- Añadir 50  $\mu$ l de anticuerpo anti- $T_3$  diluido.
- Añadir 100  $\mu$ l de [ $^{125}$ I] $T_3$  (6.000-7.000 cpm/tubo) preparada en tampón A.
- Agitar con Vórtex e incubar en oscuridad durante 12 horas a temperatura ambiente (20-25°C) ó 48 horas a 4°C.
- La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó añadiendo 1,5 ml del reactivo precipitante (se mantiene en agitación magnética constante).
- Se agitan todos los tubos durante 20 s en un agitador de gradillas y se centrifugan durante 40 min a 4.000 rpm (2.000 g) y 14°C.
- Aspiración del sobrenadante con bomba de vacío.
- Contaje de radiactividad en el precipitado (contador  $\gamma$ ). La eficacia del canal de  $^{125}$ I fue del 70%.

El contaje de cada tubo se realizó durante un min, tras la comprobación de que no existían diferencias significativas entre las cpm de tubos contados durante uno, tres o cinco min.

**2.7.1.2. RIA de tiroxina.****a) Reactivos.****- Curva estándar.**

- Se pesan 5 mg de  $T_4$  y se disuelven en 100 ml de NaOH 0,05 N. La concentración será de 50  $\mu$ g/ml (esta solución se puede conservar hasta 2 meses a 4°C).
- Se toman 128  $\mu$ l y se ajustan a 100 ml con tampón F. Esta solución tiene una concentración de 64 ng/ml (esta solución se conserva un máximo de dos semanas a 4°C).
- Tomar 1 ml de la solución anterior y ajustarlo a 10 ml con tampón F en el momento del ensayo (concentración de la solución patrón: 6,4 ng/ml).



- A partir de la solución patrón, y en el momento del ensayo, se hacen diluciones sucesivas con tampón F hasta conseguir las siguientes concentraciones de  $T_4$  en un volumen final de 50  $\mu$ l: 2,5, 5, 10, 20, 40, 80, 160 y 320 pg de  $T_4$ .

**- Anticuerpos.**

La especificidad del anticuerpo anti- $T_4$  ha sido caracterizada previamente (Ruiz de Oña *et al.*, 1991) obteniéndose las siguientes reacciones cruzadas:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
$T_4$	100
Tetrac	4,0
r $T_3$	1,7
$T_3$	1,2
Triac	0,3
3',3- $T_2$	<0,005
3,5- $T_2$	<0,005

En el caso del anticuerpo anti- $T_4$  se hizo una dilución 1:50 ("stock") que se dividió en alícuotas para 100 ó 200 tubos de RIA y se congelaron a  $-25^{\circ}\text{C}$ . A partir del "stock" se hacía una dilución 1:600, con tampón F, en el momento de realizar el RIA.

Como reactivo precipitante se utilizó la misma mezcla que en el caso del RIA de  $T_3$ .

**b) Protocolo.**

- Se pipetea 50  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la curva estándar y 50  $\mu$ l de muestra (las diluciones finales para la determinación del contenido tiroideo de  $FT_4$  y  $BT_4$  fueron 1:100 y 1:200.000, respectivamente).
- Añadir 100  $\mu$ l de anticuerpo anti- $T_4$  diluido.
- Añadir 100  $\mu$ l de [ $^{125}\text{I}$ ] $T_4$  (6.000 cpm/tubo) preparada en tampón F.
- Agitar con Vórtex e incubar en oscuridad durante 12 horas a temperatura ambiente ( $20-25^{\circ}\text{C}$ ) ó 48 horas a  $4^{\circ}\text{C}$ .
- La precipitación de los complejos antígeno-anticuerpo se realizó añadiendo 1,5 ml del reactivo precipitante (véase RIA  $T_3$ ).

- Se agitan todos los tubos durante 20 s en un agitador de gradillas y se centrifugan durante 40 min a 4.000 rpm (2.000 g) y 14°C.
- Aspiración del sobrenadante con bomba de vacío.
- Contaje de radiactividad en el precipitado.

### 2.7.2. RIAs DE HORMONAS ESTEROIDES.

Para la valoración de hormonas esteroides se utilizaron kits comerciales suministrados por Sorin Biomedica con algunas modificaciones para muestras de anfibios que consistieron fundamentalmente en la reducción a la mitad del volumen de los reactivos del kit utilizados en el ensayo y en la introducción de dos estándares inferiores a los proporcionados en la curva estándar del kit por dilución con el estándar 0 de la misma.

La validación del RIA de  $E_2$  en plasma de *R. perezii* fue realizada con anterioridad en este laboratorio (Delgado *et al.*, 1990), así como la validación de los RIAs de  $E_2$  y T en medio de cultivo de muestras procedentes de *R. perezii* (Gancedo, 1988).

#### a) Método de extracción de esteroides.

En el medio de cultivo, así como en el plasma de individuos adultos, los esteroides se determinaron directamente en las muestras sin procesamiento previo. En el caso de las larvas, se llevó a cabo un proceso de extracción.

#### - **Reactivos.**

- Tampón fosfato 0,1 M, ClNa 0,15 M, pH 7.

- $PO_4H_2K$	5,277 g/l
- $PO_4HNa_2$	14,20 g/l
- ClNa	9,00 g/l

El pH se ajusta con NaOH. Preparación el día del ensayo.

#### - **Protocolo.**

- Homogeneizar la muestra en éter dietílico (12 ml/g tejido) utilizando homogeneizadores manuales tipo Potter-Elvehjem (vidrio).
- Transferir los extractos a tubos de vidrio con tapón de rosca y centrifugar durante 30 min a 3.000 rpm (1.600 g) y 4°C.

- Recuperar los sobrenadantes y congelar rápidamente la fase acuosa en un baño de metanol y hielo seco decantando la fase de éter en tubos limpios que se evaporan a sequedad (37°C, 1-2 h) en un rotavapor bajo condiciones de vacío.
- Reconstituir las muestras en 300  $\mu$ l de tampón fosfato 0,1 M, ClNa 0,15 M, pH 7 y conservar a -25°C hasta el momento de la valoración de los esteroides.

En este caso no se calcularon recuperaciones individuales, sino que se procesaron 5 muestras añadiéndoles una cantidad mínima de [ $^{125}$ I]E<sub>2</sub> o [ $^{125}$ I]T al inicio del proceso, llevándose a cabo el conteo de radiactividad remanente tras la extracción. El porcentaje de recuperación fue aproximadamente de un 60% en ambos casos. Los datos no se han corregido teniendo en cuenta la recuperación.

#### 2.7.2.1. RIA de estradiol. (Kit DIRIA-ESTRK)

##### a) Reactivos.

- [ $^{125}$ I]E<sub>2</sub> (1,43  $\mu$ Ci de actividad específica)
- E<sub>2</sub> estándar (0, 25, 50, 100, 300, 800 y 3.000 pg/ml)
- Anticuerpo anti-E<sub>2</sub>.
- Reactivo precipitante (PEG-2º anticuerpo)

##### b) Protocolo.

- Pipetear 25  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la curva estándar (se preparan también dos estándares inferiores: 6,25 y 12,5 pg/ml) y de las muestras.
- Añadir 50  $\mu$ l del anticuerpo anti-E<sub>2</sub>.
- Añadir 50  $\mu$ l de [ $^{125}$ I]E<sub>2</sub>.
- Agitación e incubación durante 24 h a temperatura ambiente (, 20-25°C).
- Añadir 0,5 ml de reactivo precipitante a todos los tubos excepto a los totales.
- Agitación e incubación durante 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugación durante 15 min (2.000 g, 4°C).
- Decantación rápida del sobrenadante secando los restos sobre papel de filtro.
- Contaje de radiactividad del precipitado en un contador  $\gamma$ .

**c) Especificidad.**

Las reacciones cruzadas del anticuerpo son las siguientes:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
E <sub>2</sub>	100
Estrona	1,53
Estriol	0,52
20 OH-P	0,015
T	<0,012
P	<0,012
Corticosterona	<0,012
Otros esteroides	<0,012

**d) Sensibilidad.**

El límite de detección del ensayo fue inferior a los 10 pg/ml.

**e) Precisión y reproductibilidad.**

Los coeficientes de variación intra- e interensayo (n=10) son los siguientes:

	<u>Dosis (pg/ml)</u>					
	48,8	52,7	60,4	176,2	190	294
<u>C.V. %</u>						
Intra-		4,8	5,5	5,8		
Inter-	9,5				8,6	6,8

**2.7.2.2. RIA de testosterona. (Kit DIRIA-TESTOK)****a) Reactivos.**

- [<sup>125</sup>I]T (0,8 μCi de actividad específica)
- T estándar (0, 0,25, 0,5, 1,0, 2,5, 5 y 10 ng/ml)
- Anticuerpo anti-T.
- Reactivo precipitante (PEG-2º anticuerpo)

**b) Protocolo.**

- Pipetear 25  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la curva estándar (se preparan también dos estándares inferiores: 0,06 y 0,125 ng/ml) y de las muestras.
- Añadir 100  $\mu$ l del anticuerpo anti-T.
- Añadir 100  $\mu$ l de [ $^{125}$ I]T.
- Agitación e incubación durante 24 h a 37°C.
- Añadir 0,5 ml de reactivo precipitante a todos los tubos excepto a los totales.
- Agitación e incubación durante 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugación durante 15 min (2.000 g, 4°C).
- Decantación rápida del sobrenadante secando los restos sobre papel de filtro.
- Contaje de radiactividad del precipitado en un contador  $\gamma$ .

**c) Especificidad.**

Las reacciones cruzadas del anticuerpo son las siguientes:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
T	100
5-dihidroT	7,20
Androstenediona	0,81
19-noretisterona	0,20
Danazol	0,17
Dehidroepiandrosterona	0,036
5- $\alpha$ -androstan, 3- $\alpha$ , 17- $\beta$ diol	0,030
Otros esteroides	<0,020

**d) Sensibilidad.**

El límite de detección del ensayo fue de 0,05 ng/ml.

**e) Precisión y reproductibilidad.**

Los coeficientes de variación intra- (n=20) e interensayo (n=10) son los siguientes:

	<u>Dosis (ng/ml)</u>			
	<u>0,35</u>	<u>1,55</u>	<u>3,40</u>	<u>8,65</u>
<u>C.V. %</u>				
Intra-	9,4	6,5		6,8
Inter-	10,0	7,8	6,8	

### 2.7.2.3. RIA de progesterona. (Kit DIRIA-PROGK)

#### a) Reactivos.

- [ $^{125}$ I]P (1,76  $\mu$ Ci de actividad específica)
- P estándar (0, 0,5, 1,0, 3, 10, 25 y 50 ng/ml)
- Anticuerpo anti-P.
- Reactivo precipitante (PEG-2 $^{\circ}$  anticuerpo)

#### b) Protocolo.

- Pipetear 25  $\mu$ l de cada uno de los puntos de la curva estándar (se preparan también dos estándares inferiores: 0,125 y 0,25 ng/ml) y de las muestras.
- Añadir 50  $\mu$ l del anticuerpo anti-P.
- Añadir 50  $\mu$ l de [ $^{125}$ I]P.
- Agitación e incubación durante 24 h a temperatura ambiente (,20-25°C).
- Añadir 0,5 ml de reactivo precipitante a todos los tubos excepto a los totales.
- Agitación e incubación durante 15 min a temperatura ambiente.
- Centrifugación durante 15 min (2.000 g, 4°C).
- Decantación rápida del sobrenadante secando los restos sobre papel de filtro.
- Contaje de radiactividad del precipitado en un contador  $\gamma$ .

#### c) Especificidad.

Las reacciones cruzadas del anticuerpo son las siguientes:

<u>Compuesto</u>	<u>Reacción cruzada %</u>
P	100
Corticosterona	2,50
Desoxicorticosterona	2,50
17 OH-Po	2,00
Cortexolona	0,25
T	0,20
Pregnenolona	0,16
20 OH-Po	0,16
Cortisona	0,12
Androstenediona	0,10
Otros esteroides	<0,05

**d) Sensibilidad.**

La sensibilidad o límite de detección del ensayo fue inferior a 0,1 ng/ml.

**e) Precisión y reproductibilidad.**

Los coeficientes de variación intra- (n=20) e interensayo (n=10) son los siguientes:

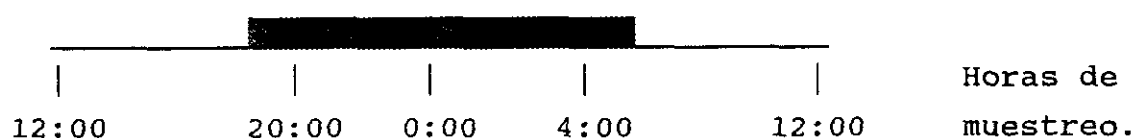
	<u>Dosis (ng/ml)</u>		
	<u>1,2</u>	<u>6,0</u>	<u>11,0</u>
<u>C.V. %</u>			
Intra-	7,2	4,7	4,6
Inter-	10,0	7,5	6,9

## **2.8. Diseños experimentales.**

Para la especificación del fotoperíodo en los diseños experimentales, se indicará en primer lugar la duración de la fase luminosa en horas seguido de la letra L ("light", luz), y a continuación la fase oscura seguido de la letra D ("darkness", oscuridad), separadas por dos puntos. Ejemplo 12L:12D.

### **2.8.1. ESTUDIO ONTOGÉNICO DE LOS CICLOS DIARIOS DE HORMONAS TIROIDEAS EN LARVAS DE *R. perezii***

Debido a la limitación en el número de larvas disponibles y considerando que la MEL podía estar implicada en los posibles cambios diarios de HT, los puntos de muestreo se seleccionaron para conseguir un mayor número de puntos situados en la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D, luces encendidas a las 6:00). Las horas de muestreo se distribuyeron según el siguiente esquema:



Para la determinación del estado de desarrollo de los embriones y larvas se utilizaron las tablas de Gosner (1960) y Taylor-Kollros (1946).

El desarrollo larvario se dividió en las siguientes etapas:

1. Eclosión (21 G).
2. Comienzo de la ingestión (25 G).
3. Premetamorfosis (26-35 G, I-X TK).
4. Prometamorfosis (36-40 G, XI-XVII TK).
5. Final del clímax (45-46 G, XXIV-XXV TK).

Debido al rápido desarrollo de las larvas en los primeros estados y al gran número de embriones necesarios, en el primero de los estados estudiados (21-22 G, Tabla de Gosner, 1960) se utilizaron larvas obtenidas mediante fecundación *in vitro*. En el resto de los estados se utilizaron larvas obtenidas de una puesta espontánea en el laboratorio.

### **2.8.2. CICLOS DIARIOS DE HORMONAS TIROIDEAS EN ADULTOS DE *R. perezii*.**

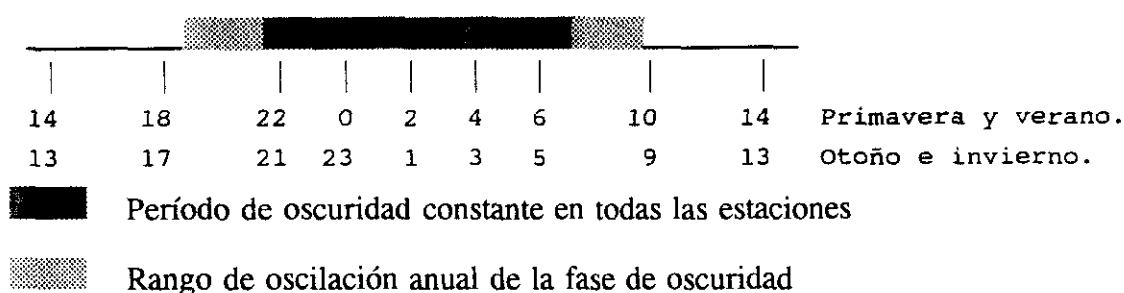
Se utilizaron animales adultos de *R. perezii* de ambos sexos ( $n=64/\text{ciclo/estación}$ ), con un peso corporal medio de  $34,46 \pm 1,11$  g, manteniéndose en el laboratorio en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura. La alimentación fue *ad libitum* con larvas de dípteros.

Dependiendo de las estaciones y debido a diferencias comportamentales que afectaron a la captura de los animales, el número de machos y hembras disponibles fue diferente, de manera que en otoño e invierno se utilizaron individuos de los dos sexos, que se



distribuyeron homogéneamente en grupos, mientras que en primavera y verano se emplearon sólo hembras y machos, respectivamente.

Los puntos seleccionados para la toma de muestras fueron distribuidos cada cuatro horas durante la fase luminosa y cada dos horas durante la fase de oscuridad del fotociclo. Se utilizó un diseño por bloques para distribuir los animales atendiendo a sus pesos corporales. En todos los puntos estacionales, la recogida de las muestras (plasma y tiroides) comenzó en el primer punto correspondiente a la fase de luz (9 ó 10 h).



Las épocas del año elegidas para el estudio de las variaciones estacionales de los ciclos diarios de HT en *R. perezii* corresponden a un mes después de los solsticios y equinoccios. Las condiciones ambientales de los puntos estacionales en el día del sacrificio fueron las siguientes:

<u>ESTACIÓN</u>	<u>FECHA</u>	<u>FOTOPERÍODO</u>	<u>TEMP. AGUA °C</u> (min-max)	<u>TEMP. AIRE °C</u> (min-max)
Primavera	(29-4-91)	13,5 L : 10,1 D	15-18	15-19
Verano	(1-8-91)	14,2 L : 9,4 D	22-26	29-33
Otoño	(22-10-91)	10,5 L : 13,1 D	12-15	13-19
Invierno	(13-1-92)	9,3 L : 14,3 D	5-8	9-17

Esta distribución de los puntos estacionales se hizo en base a estudiar los ciclos diarios en los momentos anuales en los que se alcanzan los máximos y mínimos anuales de temperatura ambiental, así como el máximo y mínimo de horas de luz diarias (verano vs invierno). Por otra parte, las diferencias en la duración del fotoperíodo entre primavera-verano y otoño-invierno son pequeñas, lo que nos permite observar los efectos de la temperatura sobre la actividad tiroidea (fotoperíodos largos en primavera y verano;

fotoperíodos cortos en otoño e invierno), disminuyendo al máximo las posibles interferencias asociadas a fotoperíodos muy distintos. Además, en la comparación primavera-otoño podemos observar el efecto del fotoperíodo sobre la actividad tiroidea ya que las temperaturas son muy parecidas, mientras que el fotoperíodo es prácticamente opuesto.

#### **2.8.3. CICLOS ESTACIONALES DE HORMONAS TIROIDEAS EN ADULTOS DE *R. perezii*.**

Se utilizaron individuos adultos de ambos sexos ( $27,28 \pm 0,83$  g) obtenidos a lo largo del año y mantenidos en el laboratorio (una semana en promedio) bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura. La alimentación fue *ad libitum* dos o tres veces por semana dependiendo de la estación, el horario de alimentación fue siempre al mediodía (12:00). En invierno, a pesar de la presencia de alimento, los animales no comían.

Los animales ( $n = 7-10/\text{sexo}/\text{mes}$ ) fueron sacrificados en ocho momentos del ciclo anual durante los años 1991-92 (1 de Enero, 13 de Marzo, 24 de Abril, 8 de Mayo, 2 de Julio, 27 de Agosto, 17 de Octubre y 11 de Noviembre) de manera que se dispone de dos puntos en cada estación anual (primavera, verano, otoño e invierno). El horario de sacrificio fue siempre de 15:00 a 17:00 un día después de la alimentación. La elección del horario de muestreo se hizo en base a los resultados obtenidos en el estudio de los perfiles diarios de la actividad tiroidea descritos en el apartado anterior.

Las condiciones climáticas (temperatura y fotoperíodo) de la zona de procedencia de los animales se han representado en la Figura 30.

En este estudio, además del plasma y el tiroides, se extirparon las gónadas y el hígado y se determinó su peso húmedo con el objeto de evaluar la evolución estacional de los correspondientes índices organosomáticos (índice gonadosomático, IGS; índice hepatosomático, IHS).

#### **2.8.4. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA EN *R. perezii*. INTERACCIONES CON OTROS EJES NEUROENDOCRINOS.**

Debido a las diferentes características que presentan en muchos aspectos las larvas y los adultos de *R. perezii*, las aproximaciones experimentales utilizadas en uno y otro caso fueron distintas.

#### **2.8.4.1. Larvas.**

En todos los experimentos se utilizaron larvas prometamórficas (36-40, G; XI-XVII, TK) debido a que, como pudimos comprobar en el estudio ontogénico (apartado 2.8.1.), en estos estados las HT todavía no han alcanzado los valores máximos, siendo susceptibles de disminuir o aumentar debido a los distintos tratamientos experimentales.

##### **a) Control hipotalámico de la actividad tiroidea. Papel del CRF.**

Se utilizaron larvas de *R. perezii* que fueron aclimatadas durante una semana antes del inicio de los experimentos a las condiciones experimentales de fotoperíodo (14L:10D, luz de 07:00 a 21:00) y temperatura ( $22 \pm 2^\circ\text{C}$ ). Las larvas se seleccionaron según su peso, tamaño y estado con el objeto de obtener grupos iniciales homogéneos.

Se realizaron 3 experimentos siguiendo el siguiente esquema:

##### **- Efecto del tratamiento crónico con hCRF.**

Dos grupos de larvas ( $n=8/\text{grupo}$ ) al inicio de la prometamorfosis (XI TK) se inyectaron (véase apartado 2.3) durante un mes en días alternos con hCRF (0,5 y 1  $\mu\text{g}$ ) diluido en una solución de Holtfreter al 10%.

##### **- Efecto del tratamiento crónico con oCRF.**

Larvas ( $n=8/\text{grupo}$ ) prometamórficas (XV TK) se inyectaron diariamente durante dos semanas con oCRF (1  $\mu\text{g}$ ) preparado en Holtfreter al 10%.

##### **- Efecto del tratamiento agudo con oCRF.**

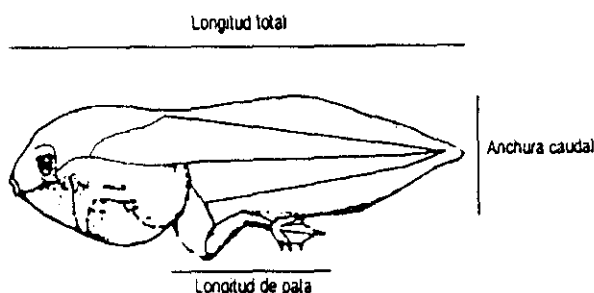
Larvas ( $n=10/\text{grupo}$ ) prometamórficas (XI-XVII TK) fueron inyectadas una única vez con oCRF (2  $\mu\text{g}$ ) en Holtfreter al 10% y se sacrificaron a las 2, 4 y 8 h tras la inyección.

Las larvas controles recibieron en todos los casos inyecciones de Holtfreter al 10% (2  $\mu\text{l}$ ). Todas las inyecciones se llevaron a cabo al final de la fase de luz del fotociclo diario.

Durante los tratamientos crónicos, que se prolongaron hasta que las larvas alcanzaban el clímax metamórfico, se anestesiaba a las larvas, se determinaba su peso húmedo, tras secarlas con papel de filtro, y a continuación se determinaban con papel milimetrado los siguientes parámetros:

- Longitud total: se considera desde el extremo más anterior de la cabeza hasta el extremo más posterior de la cola.

- Longitud de la extremidad posterior: se estiraba la extremidad posterior derecha y se medía desde la unión al tronco hasta el final del dedo más largo.
- Anchura caudal: anchura del segmento más ancho de la cola, incluyendo la aleta caudal.



El peso húmedo y la longitud total se consideraron parámetros indicadores de crecimiento, mientras que la anchura caudal y la longitud de la extremidad posterior representaban el grado de desarrollo metamórfico (Delgado *et al.*, 1984, 1987).

Al final de los distintos experimentos las larvas fueron pesadas, sacrificadas por congelación inmediata en hielo seco y congeladas a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la valoración de HT o procesadas para el estudio histológico posterior (véase apartado 2.4.).

#### b) Relaciones pineal-tiroides-gónadas.

Se utilizaron larvas prometamórficas (XV TK;  $0,37 \pm 0,01$  g) de *R. perezii*, mantenidas en el laboratorio bajo las condiciones estándar reseñadas en el apartado 1.3.2. (fotoperíodo: 12L:12D, luces encendidas a las 8:00; temperatura:  $25 \pm 2^{\circ}\text{C}$ ).

#### - Efecto de la melatonina sobre la actividad tiroidea.

En este experimento tratamos de ver el efecto tanto de un descenso como de un incremento de los niveles endógenos de MEL sobre la concentración de HT. Además, se intentó ver si la acción de la MEL podía producirse sobre diferentes procesos determinantes de la actividad tiroidea (secreción y/o metabolismo de HT). Para ello se llevó a cabo un tratamiento agudo por inmersión de las larvas en las distintas soluciones hormonales durante 12 h correspondientes a la fase oscura del fotociclo diario. Las larvas de cada grupo experimental se situaban en recipientes conteniendo 200 ml de agua desclorada con o sin hormonas. Se hicieron los siguientes grupos experimentales:

- Control (n=10).
- MEL 0,5 mM (n=10). La concentración final de MEL se conseguía mediante la adición de una alícuota (200  $\mu$ l) de una solución concentrada (0,5 M) en etanol absoluto. La proporción final de etanol fue de 0,1%.
- T<sub>4</sub> 0,1  $\mu$ M (n=10). La concentración final de T<sub>4</sub> se conseguía, de forma similar a lo visto para la MEL, añadiendo una alícuota (100  $\mu$ l) de una solución concentrada (0,2 mM) en NaOH 0,05 N. La proporción final de NaOH fue de 0,05%.
- T<sub>4</sub>+MEL (n=10). Se añadía al agua una alícuota de las soluciones de T<sub>4</sub> y MEL reseñadas en los dos anteriores grupos.

La proporción final de los disolventes (NaOH y etanol) se igualó en todos los grupos experimentales. Las soluciones concentradas de hormonas se preparaban el mismo día del experimento.

Para conseguir el descenso de los niveles endógenos de MEL se privó a las larvas de una noche mediante el tratamiento agudo con luz constante, 24L (Pang *et al.*, 1985) y se repitieron los mismos grupos experimentales bajo estas condiciones.

Al final del tratamiento, y coincidiendo con el inicio de la fase de luz, se sacrificaban las larvas, se pesaban y se conservaban a -25°C hasta el momento de la valoración de HT.

#### **- Efecto de los esteroides gonadales sobre la actividad tiroidea.**

Se llevó a cabo un tratamiento agudo que, de manera análoga a lo descrito en el apartado anterior, consistió en inmersión de las larvas en la solución hormonal (E<sub>2</sub> o T) durante 12 h correspondientes a la fase oscura del fotociclo diario. Los grupos experimentales realizados fueron:

- Control (n=10).
- E<sub>2</sub> 5  $\mu$ M (n=10). La concentración final en el agua fue conseguida añadiendo una alícuota (100  $\mu$ l) de una solución concentrada (10 mM) en etanol absoluto. La proporción final de etanol fue de 0,05%.
- T 5  $\mu$ M (n=10). Se añadió una alícuota (100  $\mu$ l) de una solución concentrada (10 mM) en etanol absoluto. La proporción final de etanol en el agua fue de 0,05%.

El grupo control recibió la misma cantidad de etanol.

Al final del tratamiento, y coincidiendo con el inicio de la fase de luz, se sacrificaban las larvas, se pesaban y se conservaban a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la valoración de HT.

**- Efecto de las hormonas tiroideas y la melatonina sobre los esteroides gonadales.**

Con el propósito de comprobar si las interacciones entre estos ejes neuroendocrinos se producen en los dos sentidos, se llevó a cabo un tratamiento agudo, según el protocolo anteriormente citado (inmersión durante 12 h, fase oscura). Los grupos experimentales fueron:

- Control ( $n=10$ ).
- $T_3$  1 nM ( $n=10$ ). Se añadía al agua (200 ml) una alícuota (100  $\mu\text{l}$ ) de una solución concentrada (2  $\mu\text{M}$ ) en NaOH 0,05 N. Proporción final de NaOH en el agua: 0,05 %.
- $T_4$  1 nM ( $n=10$ ). Se añadía al agua una alícuota (100  $\mu\text{l}$ ) de una solución concentrada (2  $\mu\text{M}$ ) en NaOH 0,05 N. Proporción final de NaOH en el agua: 0,05 %.
- MEL 0,5 mM ( $n=10$ ). La concentración final de MEL se conseguía mediante la adición de una alícuota (200  $\mu\text{l}$ ) de una solución concentrada (0,5 M) en etanol absoluto. La proporción final de etanol fue de 0,1 %.

La proporción final de cada disolvente en el agua se igualó en todos los grupos experimentales.

Al final del tratamiento, y coincidiendo con el inicio de la fase de luz, se sacrificaban las larvas, se pesaban y se conservaban a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la valoración de  $E_2$  y T.

**2.8.4.2. Adultos.**

**a) Relación pineal-tiroides.**

**- Efecto de la pinealectomía y la ceguera sobre la actividad tiroidea.**

En este experimento intentamos determinar el efecto de un descenso crónico de los niveles endógenos de MEL, mediante la extirpación quirúrgica de las dos fuentes principales de esta hormona en adultos de *R. perezii*, la glándula pineal y los ojos.

Se utilizaron hembras adultas de *R. perezii* ( $42,34 \pm 1,26$  g) que se mantuvieron en el laboratorio en condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura durante los meses de Julio-

Agosto. La alimentación fue forzada con hígado de pollo 3 veces por semana, conservándose el peso de los animales durante el período experimental.

Grupos experimentales:

- Control (n=16)
- Pinealectomía y ceguera, Px+Cx (n=16)

Tras la intervención quirúrgica (véanse apartados 2.2.2 y 2.2.3) los animales se mantuvieron durante 50 días, al cabo de los cuales se sacrificaron (n=8/grupo) en dos momentos del fotociclo diario (segunda mitad de la fase luminosa y segunda mitad de la fase oscura), con el objeto de observar posibles alteraciones en los perfiles día/noche de HT. La elección de las horas de sacrificio se hizo en base a los datos obtenidos en los ciclos diarios.

En este estudio, además del plasma y las glándulas tiroideas, también se extirparon el hígado, gónadas y cuerpos grasos.

#### **b) Relación tiroides-gónadas.**

##### **- Efecto de la ovariectomía sobre la actividad tiroidea.**

Con este experimento intentamos ver la influencia de un descenso de los niveles endógenos de esteroides sexuales ( $E_2$ ) sobre la actividad tiroidea de hembras sexualmente maduras de *R. perezi* ( $39,24 \pm 1,91$  g) que se mantuvieron bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura en Junio-Julio. La alimentación fue forzada con hígado de pollo 2 veces a la semana.

Se repitió el mismo diseño experimental en dos ocasiones y se hicieron los siguientes grupos experimentales:

- Control (n=20)
- Ovariectomía, Ovx (n=20)

La mitad de los animales (n=10/grupo) se sacrificaron a la semana (Control7 y Ovx7) de la intervención quirúrgica (véase apartado 2.2.1.) y la mitad restante (n=10/grupo) se sacrificó al mes (Control30 y Ovx30). El horario de sacrificio fue entre las 15:00 y 17:00 en los dos casos, y se extrajeron muestras de plasma para la valoración de  $E_2$ , P y HT, así como los tiroides para la determinación del contenido de HT. También se extirparon el hígado, los cuerpos grasos y el oviducto.

**- Efecto del estradiol sobre la actividad tiroidea *in vitro*.**

Para estudiar el posible efecto directo del  $E_2$  ( $1 \mu M$ ) sobre la producción de HT, se llevó a cabo un cultivo *in vitro* de tiroides (véase apartado 2.6.) procedentes de hembras de *R. perezii* ( $n=7$ ,  $38,46 \pm 9,47$  g) que habían sido mantenidas en el laboratorio bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura durante el mes de Abril y que habían sido alimentadas de manera forzada con hígado de pollo 3 veces en semana. El horario de sacrificio fue el mismo que en el caso anterior.

Los tiroides procedentes de un mismo animal se distribuyeron de manera que uno se utilizó de control mientras que el otro fue tratado con  $E_2$ . El cultivo se realizó durante 12 horas y el medio era renovado totalmente cada 3 horas, recogándose muestras para la valoración de HT.

**- Efecto de inhibidores tiroideos y  $T_3$  sobre los esteroides gonadales *in vivo*.**

Para el estudio del efecto de las HT sobre el eje gonadal se utilizaron hembras sexualmente maduras de *R. perezii* ( $30,71 \pm 2,32$  g) que fueron mantenidas en el laboratorio bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura durante el mes de Julio. La alimentación fue forzada con hígado de pollo 3 veces por semana.

Como inhibidores de la actividad tiroidea se utilizaron ácido iopanoico (IOP) y propiltiouracilo (PTU). Los grupos experimentales fueron los siguientes:

- Control ( $n=8$ ).
- IOP+PTU ( $n=8$ ).
- IOP+PTU+ $T_3$  ( $n=8$ ).

**- Preparación de los tratamientos hormonales:**

- IOP (0,5 mg/10 g peso). Se disolvió inicialmente en un pequeño volumen de NaOH 0,1 N y se llevó a la dosis final con tampón sodio-fosfato 0,15 M, pH 7,35. Volumen de inyección: 50-80  $\mu l$  según el peso.
- PTU (1 mg/10 g de peso). Se disolvió inicialmente en un pequeño volumen de NaOH 1 N y se llevó a la dosis final deseada con una mezcla (50%) de Ringer de anfibios y tampón sodio-fosfato 0,15 M, pH 7,35. Volumen de inyección: 100-200  $\mu l$  según el peso.



- $T_3$  ( $2 \mu\text{g}/10 \text{ g}$  de peso). Se partía de una solución concentrada ( $10 \text{ mg/ml}$ ) en  $\text{NaOH}$   $0,05 \text{ N}$  y se llevaba a las dosis finales con Ringer de anfibios. Volumen de inyección:  $50\text{-}80 \mu\text{l}$  según el peso.

El pH de las soluciones hormonales se comprobó antes de la inyección y se ajustó con  $\text{ClH}$   $1 \text{ N}$  cuando fue necesario con el fin de mantenerlo en un rango de pH  $7,5\text{-}8,5$ .

El tratamiento duró 15 días y los animales fueron inyectados diariamente al mediodía ( $12:00$ ) en el saco linfático ventral. Los animales controles recibieron inyecciones del mismo volumen de disolvente. El horario de sacrificio fue igual al de los casos anteriores y se recogieron muestras de plasma, para valorar HT y  $E_2$ , así como los tiroides, el hígado, las gónadas, los cuerpos grasos y el oviducto.

#### - Efecto de $T_3$ sobre la producción de esteroides gonadales *in vitro*.

Con el fin de determinar si la  $T_3$  es capaz de ejercer un efecto directo sobre la producción de esteroides gonadales, se llevó a cabo un cultivo *in vitro* de ovocitos (véase apartado 2.6.) procedentes en su totalidad de una de las ranas utilizadas en los experimentos de Ovariectomías y que se seleccionaron en base a su estado de maduración para asegurar su capacidad de respuesta. Asimismo, se utilizaron las gónadas de un único animal con el propósito de obtener una mayor fiabilidad y homogeneidad en los resultados (Gancedo, 1988).

Se hicieron 4 grupos experimentales:

- Control real ( $n=5$ ).
- Control positivo ( $n=5$ ), tratado con homogeneizado de hipófisis ( $0,5 \text{ equ de hipófisis/ml}$ ).
- Control negativo ( $n=5$ ), tratado con GCH ( $50 \text{ UI/ml}$ ).
- $T_3$   $10 \text{ pM}$  ( $n=5$ ).

El cultivo se prolongó durante  $12 \text{ h}$  y el medio fue renovado totalmente cada  $3 \text{ horas}$ , recogiendo muestras para la valoración de  $E_2$ ,  $T$  y  $P$ .

#### **2.8.5. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA EN *R. perezii*. EFECTO DEL FOTOPERÍODO, LA TEMPERATURA Y LA ALIMENTACIÓN.**

Con el objeto de estudiar el efecto de distintos factores ambientales sobre la actividad tiroidea en *R. perezii*, se llevaron a cabo los siguientes diseños experimentales que se han

organizado, de manera similar al apartado anterior (2.8.4.), separando larvas e individuos adultos.

La elección de las temperaturas utilizadas en el estudio de la influencia de este factor ambiental sobre la actividad tiroidea, tanto de larvas como de adultos, de *R. perezii* (apartados 2.8.5.1.b y 2.8.5.2.b), se hizo en base al rango de temperaturas que esta especie, así como otros muchos anfibios anuros de la región templada, experimenta en la naturaleza (Duellman y Trueb, 1986).

#### **2.8.5.1. Larvas.**

##### **a) Efecto del fotoperíodo.**

Se utilizaron larvas en prometamorfosis avanzada (XVI-XVII TK;  $0,53 \pm 0,01$  g) que fueron mantenidas en el laboratorio bajo las condiciones estándar de fotoperíodo (12L:12D, luces encendidas a las 8:00) y temperatura ( $25 \pm 2^\circ\text{C}$ ).

Las larvas fueron divididas en 3 grupos:

- Control (n=20), se mantuvo en 12L:12D.
- 24L (n=20), se mantuvo en condiciones de iluminación constante.
- 24D (n=20), se mantuvo en condiciones de oscuridad constante.

El período de aclimatación a las condiciones experimentales de iluminación (24L y 24D) fue de una semana.

Los animales (n=10/grupo) se sacrificaron en dos momentos del fotociclo diario, al mediodía y a la medianoche, y se conservaron a  $-25^\circ\text{C}$  hasta el momento de la valoración de HT.

##### **b) Efecto agudo de la temperatura.**

En estos experimentos se analizó el efecto agudo (24 h) de la temperatura sobre la concentración de HT. Se emplearon larvas prometamórficas (XV TK) de *R. perezii* mantenidas bajo un fotoperíodo 12L:12D (luz de 8:00 a 20:00).

En un experimento preliminar, las larvas ( $1,28 \pm 0,04$  g), que habían sido mantenidas a  $17 \pm 1^\circ\text{C}$ , se dividieron en tres grupos (n=10/grupo):

- Control ( $17 \pm 1^\circ\text{C}$ )
- Temperatura alta ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ )

- Temperatura baja ( $5 \pm 1^\circ\text{C}$ )

Las larvas se sacrificaron a mitad de la fase de luz.

Posteriormente, se llevó a cabo otro experimento similar en el que las larvas ( $n=54$ ;  $0,40 \pm 0,01$  g) fueron aclimatadas durante dos semanas a  $20 \pm 1^\circ\text{C}$  y al final de este período se dividieron en tres grupos ( $n=18/\text{grupo}$ ):

- Control ( $20 \pm 1^\circ\text{C}$ )
- Temperatura alta ( $30 \pm 1^\circ\text{C}$ )
- Temperatura baja ( $10 \pm 1^\circ\text{C}$ )

Los animales fueron sacrificados al mediodía ( $n=9/\text{grupo}$ ) y a la medianoche ( $n=9/\text{grupo}$ ).

En los dos casos los animales se conservaron a  $-25^\circ\text{C}$  hasta la valoración de HT.

#### c) Efecto de la alimentación.

Se utilizaron larvas prometamórficas (XIII TK;  $0,31 \pm 0,01$  g) mantenidas en el laboratorio bajo un fotoperíodo estándar (12L:12D, luces encendidas a las 4:00) y una temperatura de  $20 \pm 1^\circ\text{C}$ .

Los grupos experimentales de larvas ( $n=18/\text{grupo}$ ) fueron:

- Control (C), alimentadas *ad libitum* durante el período experimental (una semana).
- Ayuno (A), no recibieron alimento durante una semana.
- Realimentación (R), al cabo de una semana de ayuno se les proporcionó alimento a las 8:00.

Las larvas se sacrificaron a las dos horas de la presentación del alimento, coincidiendo con la mitad de la fase de luz ( $n=9/\text{grupo}$ ) y a las 14 horas de la realimentación coincidiendo con la medianoche ( $n=9/\text{grupo}$ ), y fueron conservadas a  $-25^\circ\text{C}$  hasta la valoración de HT.

#### 2.8.5.2. Adultos.

##### a) Efecto del fotoperíodo.

Se emplearon individuos adultos de ambos sexos ( $29,79 \pm 0,9$  g) de *R. perezii* mantenidos bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura en Mayo-Junio. La alimentación fue forzada con hígado de pollo 2 veces por semana.

Los animales ( $n=14-18/\text{grupo}$ ) se dividieron en 3 grupos:

- Control, se mantuvo al fotoperíodo natural (15L:9D).
- 24L, se mantuvo en luz constante.
- 24D, se mantuvo en oscuridad constante.

La aclimatación a 24L y 24D duró tres semanas. Los animales se sacrificaron en la segunda mitad de la fase de luz ( $n=7-9/\text{grupo}$ ) y en la segunda mitad de la fase oscura ( $n=7-9/\text{grupo}$ ), con el fin de poder comparar los resultados con los obtenidos en el experimento de pinealectomía y ceguera (2.8.4.2.a). Se extrajeron muestras de plasma y tiroides.

**b) Efecto crónico de la temperatura: Aclimatación térmica.**

Se utilizó el mismo diseño experimental en dos épocas del año: verano (Julio-Agosto) e invierno (Enero-Febrero). Se emplearon individuos adultos de ambos sexos ( $33,18 \pm 1,58$  g) de *R. perezii* que habían sido mantenidos en el laboratorio bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura y alimentación *ad libitum* con larvas de dípteros durante al menos un mes (fase de estandarización) previo al período de aclimatación térmica. La duración del período de aclimatación fue de 40 días en las dos épocas del año y las condiciones de aclimatación fueron las siguientes:

- Aclimatación a calor:  $25 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Aclimatación a frío:  $5 \pm 1^\circ\text{C}$ .
- Fotoperíodo: 12L:12D (para ambos grupos)

El fotoperíodo se mantuvo constante con el fin de poder valorar exclusivamente los efectos crónicos de la temperatura. La iluminación se llevó a cabo mediante tubos fluorescentes situados en las cámaras de aclimatación (potencia total, 216 W), manteniéndose las luces encendidas de 8:00 a 20:00. La alimentación durante este período se efectuó al mediodía y fue forzada con hígado de pollo 3 veces por semana en el caso de los grupos de calor y 2 veces por semana en el caso de los grupos de frío, con el fin de mantener constante el peso corporal de los animales durante el período experimental.

Al término de la fase de aclimatación, los animales fueron sacrificados al cabo de al menos 24 h a partir de la última alimentación en dos momentos del fotociclo diario, coincidiendo con la mitad de la fase luminosa (14:00) y la mitad de la fase oscura (2:00). El sacrificio (7-10/hora de muestreo) se efectuó por decapitación y las muestras (plasma y tiroides) se mantuvieron a  $-25^\circ\text{C}$  hasta el momento de la valoración de HT.

### c) Efecto de la alimentación.

En este experimento se intentó determinar el efecto que tenía una única comida sobre la actividad tiroidea tras un período de ayuno. Para este estudio se utilizaron hembras de *R. perezii* ( $33,88 \pm 2,74$  g) que fueron mantenidas bajo condiciones naturales de fotoperíodo y temperatura en Agosto.

Los animales se dividieron en dos grupos experimentales ( $n=12/\text{grupo}$ ):

- Ayuno (A), se mantuvieron en ayuno durante una semana.
- Realimentación (R), tras una semana de ayuno los animales fueron alimentados de forma forzada con una cantidad de larvas de dípteros equivalente al 1% del peso corporal de cada animal.

Al final del período experimental, y bajo anestesia, se extrajo un pequeño volumen de sangre con capilares heparinizados a través de una pequeña abertura practicada en la piel ventral y mediante punción de la vena lateral con una aguja fina. Este procedimiento se realizó a las 4, 8 y 24 h de la alimentación, siendo sacrificados los animales en la última hora de muestreo. Las muestras (plasma y tiroides) se congelaron a  $-25^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de la valoración de HT y glucosa. Además, se determinó el hematocrito a las distintas horas para evaluar el efecto del muestreo repetido.

## 2.9. **Análisis estadístico de los resultados.**

Cuando los niveles hormonales fueron inferiores al límite de detección de los ensayos, se tomó este último como valor para el análisis estadístico de los datos. Aquellos datos que se alejaban de la media en un valor superior al doble de la desviación típica fueron desechados.

### 2.9.1. ANÁLISIS DE REGRESIÓN Y CORRELACIÓN.

#### a) Regresión y correlación lineales.

Existe mucha confusión acerca de esta materia, tratándose en muchas ocasiones los problemas de correlación como si fueran de regresión y viceversa, debido a las estrechas relaciones matemáticas existentes entre estos dos métodos de análisis (de hecho, el coeficiente de correlación ( $r$ ) es igual al coeficiente de regresión ( $b$ ) multiplicado por el cociente de las

desviaciones típicas de las variables). Sin embargo, mientras que en regresión se intenta describir la dependencia de una variable y sobre una variable independiente  $x$ , que viene dada por la función  $y = a + bx$ ; en correlación se trata de determinar si dos variables son independientes o varían conjuntamente, es decir, covarían, sin expresar una como función de la otra.

En nuestro caso se aplicaron ambos tipos de análisis para evaluar la recuperación analítica en la validación de los RIAs de HT y esteroides gonadales para muestras de anfibios.

Cuando el objetivo primordial era conocer el grado en que dos variables variaban conjuntamente, se aplicó únicamente el análisis de correlación.

#### **b) Comparación de la pendiente de dos rectas.**

En algunas ocasiones resulta necesario probar si las líneas de regresión obtenidas a partir de varios conjuntos de datos análogos son iguales, para lo cual se comparan las pendientes de ambas rectas, con el fin de averiguar si ambas proceden de la misma población.

Para llevar a cabo dicho análisis se utiliza un ANOVA en el cual se compara, mediante un estadístico  $F$ , el cuadrado medio debido a la diferencia entre las distintas pendientes (variación entre regresiones), con el promedio ponderado de las desviaciones respecto de la regresión (variación dentro de las regresiones). Si dicho estadístico es mayor que el valor crítico  $F_{\alpha,1,n-2}$ , entonces se concluye que las pendientes son estadísticamente diferentes y que los datos proceden de poblaciones distintas (Sokal y Rohlf, 1979).

Este test estadístico ha sido utilizado en la validación de los RIAs de HT y hormonas esteroides (paralelismo entre muestras biológicas y curvas estándares del RIA, previa transformación logística-logarítmica para conseguir la linealización de las curvas).

#### **2.9.2 TEST $t$ DE STUDENT.**

En los casos en los que se trataba de analizar si las medias muestrales obtenidas a partir de dos únicos tratamientos experimentales procedían de una misma población, se aplicó un test simple como es el de la  $t$  de Student para datos pareados o independientes según el diseño experimental.

### **2.9.3. ANÁLISIS DE LA VARIANZA (ANOVA) Y TEST DE DUNCAN DE COMPARACIONES MÚLTIPLES.**

En todos los casos en los que se aplicó un ANOVA, se comprobó en primer lugar la normalidad de las variables, por ser uno de los requisitos necesarios para su utilización (Sokal y Rohlf, 1979), mediante la aplicación del test de Kolmogorov-Smirnov.

Debido al método utilizado en la estimación de los valores hormonales sobre una función curvilínea (curva estándar del RIA), aparece una marcada correlación entre la desviación y la media de los datos, con lo cual no se cumple la condición de homogeneidad de las varianzas, requisito para la aplicación del ANOVA. Para conseguir esta homocedasticidad se realizó la transformación logarítmica de los valores hormonales, tras esta transformación se aplicó el test de Bartlett para probar si la homogeneidad de varianzas se había conseguido.

A continuación expondremos los supuestos generales en los que se utilizaron este tipo de análisis estadísticos y trataremos, a modo de ejemplo, su aplicación en algunos casos específicos.

Cuando el número de medias muestrales a comparar fue superior a dos, pero el criterio de clasificación de las mismas fue único, es decir, cuando existía un único factor o fuente de variación, se utilizó el ANOVA de una vía (ANOVA1) y en el caso de que éste fuera significativo, se aplicó a continuación el test de Duncan de comparaciones múltiples para determinar los pares de muestras que presentaban diferencias significativas.

#### **a) Ciclos diarios de hormonas tiroideas.**

Para el análisis estadístico de los datos obtenidos durante los ciclos diarios, se utilizó un ANOVA1 con el fin de probar la existencia de un ciclo diario, es decir, que las diferencias entre los valores obtenidos en distintos puntos del ciclo sean significativas.

Si el ANOVA1 anterior es significativo, se pasa a averiguar qué valores nocturnos del parámetro estudiado muestran diferencias con los valores diurnos utilizando el test de Duncan para comparaciones múltiples.

En aquellos casos en que existían dos fuentes de variación de igual rango (factores), se aplicó un ANOVA de doble vía (ANOVA2) con el fin de determinar la influencia de los

dos factores principales, así como su posible interacción. Dicha interacción es propia de multitud de procesos biológicos (Sokal y Rohlf, 1979), y en general se puede clasificar en dos clases:

- **Sinergia.** Cuando el efecto observado al actuar dos factores conjuntamente es mucho mayor que la suma de los efectos de cada factor por separado.
- **Interferencia.** Cuando el efecto de los dos factores actuando conjuntamente es mucho menor que la suma del efecto de cada factor por separado.

#### **b) Ciclos estacionales de hormonas tiroideas.**

En el caso de los ciclos estacionales en primer lugar se utilizó un ANOVA2 con el objeto de probar, tanto la existencia de un ciclo estacional, y por tanto, diferencias significativas entre los distintos puntos anuales, como la aparición de diferencias debidas al sexo en estos ciclos. A continuación, siendo el ANOVA significativo, se aplicó, de forma similar al caso de los ciclos diarios, el test de Duncan de comparaciones múltiples, con el fin de identificar los meses que presentaban valores significativamente diferentes y las diferencias entre sexos en un mismo mes.

Cuando el modelo requería estudiar los efectos de varios factores (efectos principales) dentro del mismo diseño experimental, se utilizó un análisis multifactorial de la varianza o ANOVA de múltiple vía (MANOVA). Este análisis estadístico, de forma similar a lo que ocurría con el ANOVA2, además de analizar el efecto de cada factor sobre el parámetro en estudio, proporciona información sobre la interacción de los efectos principales entre sí. En el caso de que la interacción entre factores no sea significativa se cumpliría el supuesto de aditividad de los efectos principales, permitiendo individualizar el efecto de cada factor sobre la variable en estudio con respecto al resto de los factores. Cuando existen interacciones se trataría de un modelo multiplicativo y la interpretación de los efectos de cada factor se complica. Sin embargo, si los efectos principales son multiplicativos en lugar de aditivos, es posible simplificar el análisis estadístico aplicando la transformación logarítmica, que reduce el modelo multiplicativo a uno aditivo, aplicándose a continuación el MANOVA.

Además, la utilidad MANOVA permite determinar la potencia relativa de cada factor sobre los valores de la variable estudiada mediante la aplicación de un modelo matemático de partición de la varianza. Para el cálculo de los coeficientes del modelo se aplicó en primer



lugar un modelo factorial completo que permite obtener la significación estadística de todos los factores y las interacciones correspondientes, a continuación se aplica nuevamente el modelo pero esta vez restringiéndonos a los factores e interacciones que habían resultado previamente significativas. A partir de estos resultados, y tomando como grupo de referencia el de menor media, se asocia cada factor e interacción a un coeficiente proporcional a la potencia de su efecto. La validez del modelo estimado se comprobó mediante la comparación de los valores observados en cada grupo con los esperados según el modelo, de manera que la diferencia o residuo, tras la normalización respecto a la desviación estándar media, ha de ser menor que uno. Por tanto, este proceso permite identificar los grupos que no se ajustan al modelo.

**c) Aclimatación térmica.**

En este estudio los factores considerados en la aplicación del MANOVA fueron los siguientes:

- Época del año (verano e invierno).
- Temperatura de aclimatación (25° y 5°C).
- Momento del fotociclo en que se sacrificaron los animales (mediodía y medianoche).

Posteriormente se aplicó el test de Duncan de comparaciones múltiples para detectar las diferencias significativas entre los valores de HT de los distintos grupos experimentales.

**d) Cultivos *in vitro*.**

Los datos fueron analizados mediante un MANOVA. Se aplicó un modelo multiplicativo, lo que conlleva una transformación logarítmica previa de los datos. El test de Bartlett fue aplicado para probar la homogeneidad de las varianzas.

Debido al hecho de que se obtienen varias muestras de medio consecutivas de cada tiroides o grupo de ovocitos, con el fin de estudiar el efecto del tiempo de cultivo sobre la producción de HT o esteroides, se aplicó el análisis de multivarianza para datos repetidos. Para detectar las diferencias entre los distintos tratamientos en cada período de cultivo se aplicó el test de Duncan.

## **IV.RESULTADOS**

## 1. VALIDACIÓN DE LOS RADIOINMUNOENSAYOS (RIAs).

### 1.1. Validación de los RIAs de hormonas tiroideas.

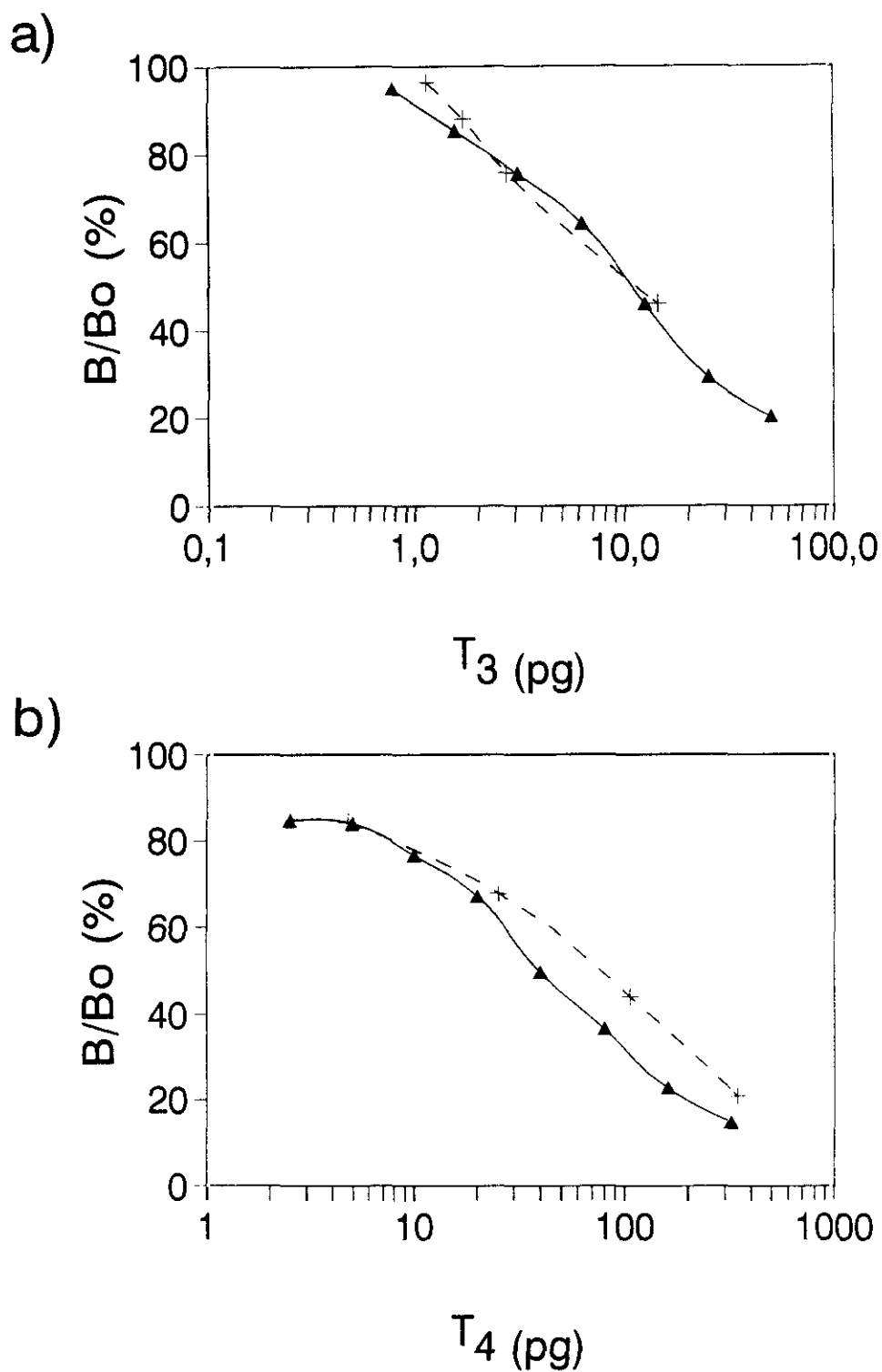
#### 1.1.1. PARALELISMO.

##### a) Efecto del proceso de extracción sobre los RIAs.

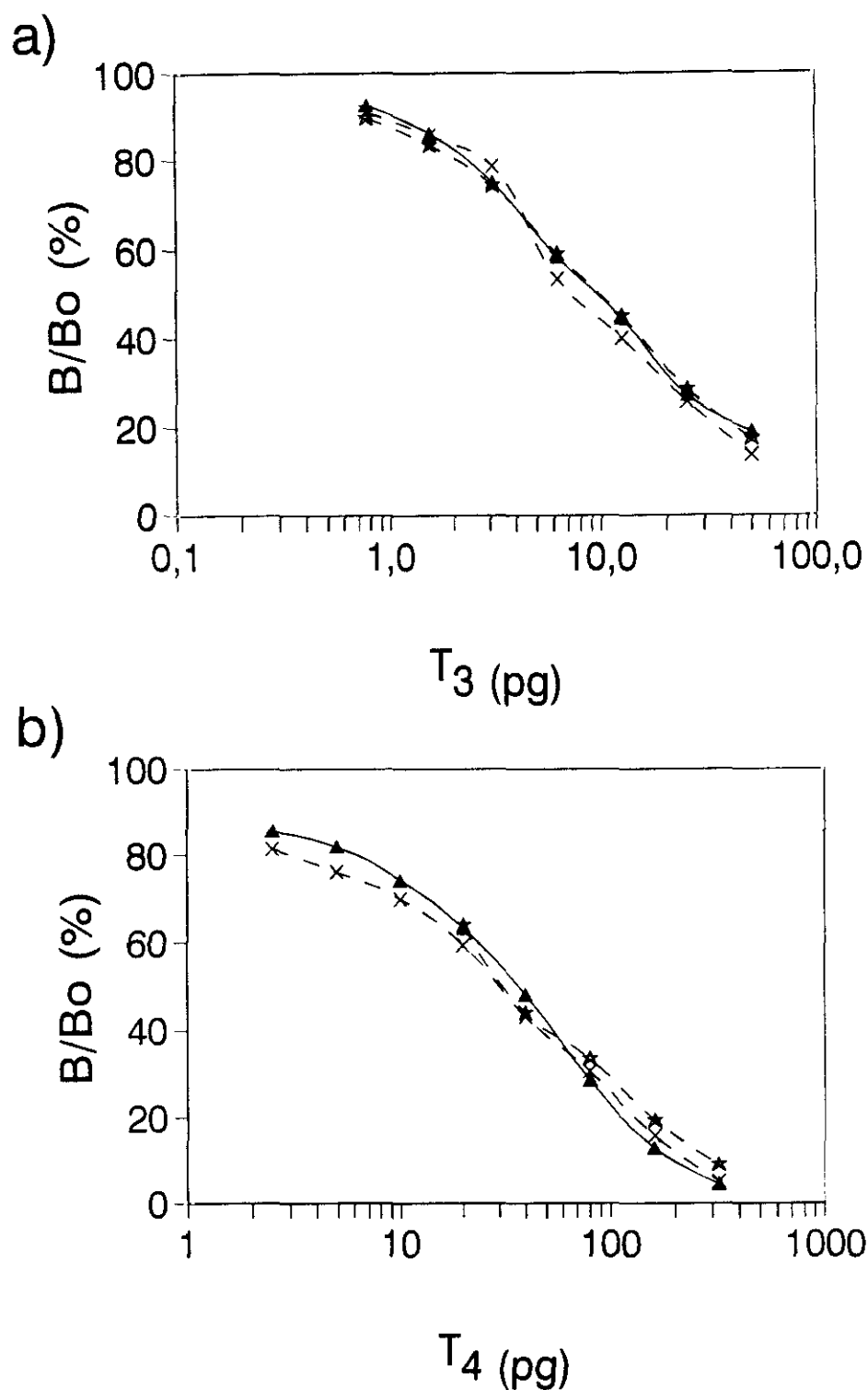
Para la valoración de  $T_3$  y  $T_4$  en larvas y plasma de individuos adultos de *R. perezi*, es necesario realizar un proceso de extracción previo. Con el fin de comprobar los posibles efectos de este proceso sobre el desarrollo de los RIAs, se compararon una curva estándar normal con varios puntos de una curva extraída siguiendo el método general descrito en el apartado de Materiales y Métodos (2.7.1.a). El paralelismo observado entre ambas curvas, tanto para  $T_3$  como para  $T_4$  (Fig. 1), indica que el proceso de extracción no modifica las características del RIA, es decir la capacidad de unión del anticuerpo no se ve alterada. Dicho paralelismo fue comprobado mediante la comparación de las pendientes tras la transformación logit-log ( $T_3$ : estándar,  $b = -2,021 \pm 0,092$ ; extraída,  $b = -2,516 \pm 0,642$ ;  $p > 0,1$ ;  $T_4$ : estándar,  $b = -1,547 \pm 0,104$ ; extraída,  $b = -1,449 \pm 0,136$ ;  $p > 0,1$ ).

##### b) Efecto del procesamiento del tiroides sobre los RIAs.

En el caso de los tiroides de individuos adultos de *R. perezi*, no se realizó el proceso de extracción al que hacíamos referencia en el apartado anterior, sino que, en primer lugar, se sometían a una extracción en metanol para obtener la fracción libre de yodotironinas; y posteriormente, se llevaba a cabo la digestión proteolítica del precipitado con pronasa. Para probar el posible efecto de este tratamiento sobre el desarrollo de los RIAs, se compararon, de manera análoga a lo visto en el apartado anterior, una curva estándar con una curva extraída con metanol y con una curva digerida con pronasa siguiendo los métodos generales reseñados en Materiales y Métodos (2.7.1.b). Tanto en el caso de la  $T_3$  como en el de la  $T_4$ , no se encontraron diferencias significativas (Fig. 2) entre las curvas cuando se compararon las pendientes tras la transformación logit-log ( $T_3$ : estándar,  $b = -1,999 \pm 0,048$ ; extraída,  $b = -1,837 \pm 0,047$ ; digerida,  $b = -2,191 \pm 0,076$ ;  $p > 0,1$ ;  $T_4$ : estándar,  $b = -2,045 \pm 0,344$ ; extraída,  $b = -1,535 \pm 0,184$ ; digerida,  $b = -1,804 \pm 0,173$ ;  $p > 0,05$ ). La existencia de paralelismo, por tanto, indica que el procesamiento de las glándulas tiroideas tampoco modifica la capacidad de unión del anticuerpo.



**Figura 1.** Paralelismo entre las curvas estándares (▲—▲) de los RIAs de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y varios puntos de una curva extraída (+--+ +) siguiendo el método general descrito en el apartado de Material y Métodos (2.7.1.a). Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 2.** Paralelismo entre las curvas estándares de los RIAs de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  realizadas de forma directa ( $\triangle$ — $\triangle$ ) o tras su extracción con metanol ( $\star$ -- $\star$ ) y digestión con pronasa ( $\times$ -- $\times$ ). Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).

A continuación, para determinar si dicho paralelismo se mantenía en las distintas muestras biológicas, se procedió a la comparación de las curvas estándares con las curvas obtenidas a partir de diluciones sucesivas de las muestras:

**c) Larvas.**

En la Figura 3 podemos observar el paralelismo existente entre las diluciones sucesivas de los extractos de larvas con las curvas estándares de  $T_3$  y  $T_4$ . Tras la transformación logit-log de los datos se aprecia la no existencia de diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las pendientes de las rectas obtenidas ( $T_3$  estándar,  $b = -2,004 \pm 0,128$ ; diluciones,  $b = -1,564 \pm 0,073$ ;  $T_4$  estándar,  $b = -1,741 \pm 0,125$ ; diluciones,  $b = -1,031 \pm 0,057$ ).

**d) Plasma y tiroides de adultos.**

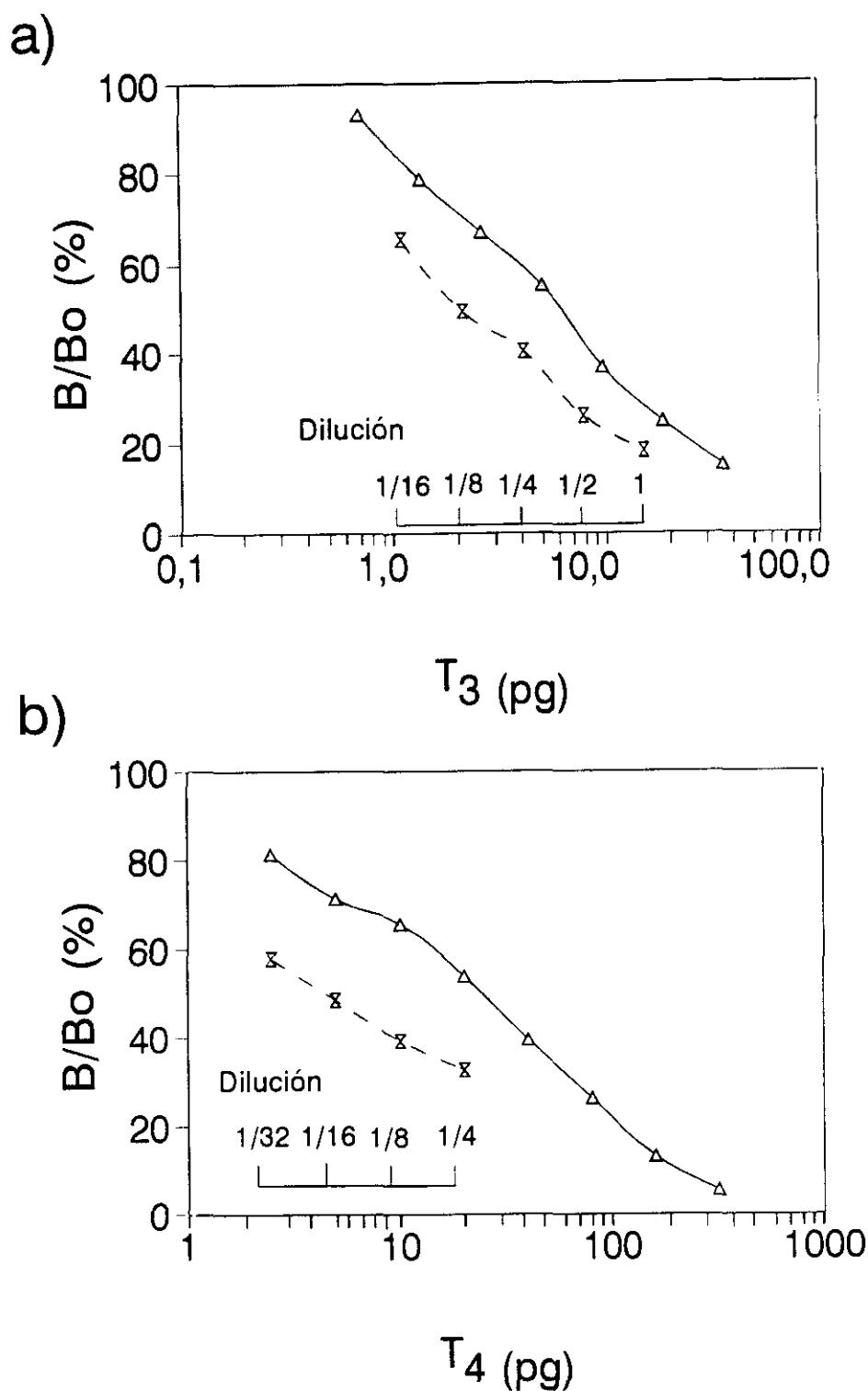
En cuanto a las muestras obtenidas en adultos de *R. perezii* (Fig. 4), se mantuvo el paralelismo ( $p > 0,1$ ) entre las curvas estándares de HT (los datos referentes a las curvas estándares de  $T_3$  y  $T_4$  son los mismos que en el apartado anterior) y los extractos de plasma ( $T_3$ ,  $b = -1,659 \pm 0,042$ ;  $T_4$ ,  $b = -1,271 \pm 0,032$ ). Resultados similares ( $p > 0,1$ ) se obtuvieron tanto con las fracciones libres ( $T_3$ ,  $b = -1,868 \pm 0,117$ ;  $T_4$ ,  $b = -1,037 \pm 0,028$ ), como con las unidas ( $T_3$ ,  $b = -2,323 \pm 0,253$ ;  $T_4$ ,  $b = -1,132 \pm 0,194$ ).

**e) Medio de cultivo de tiroides.**

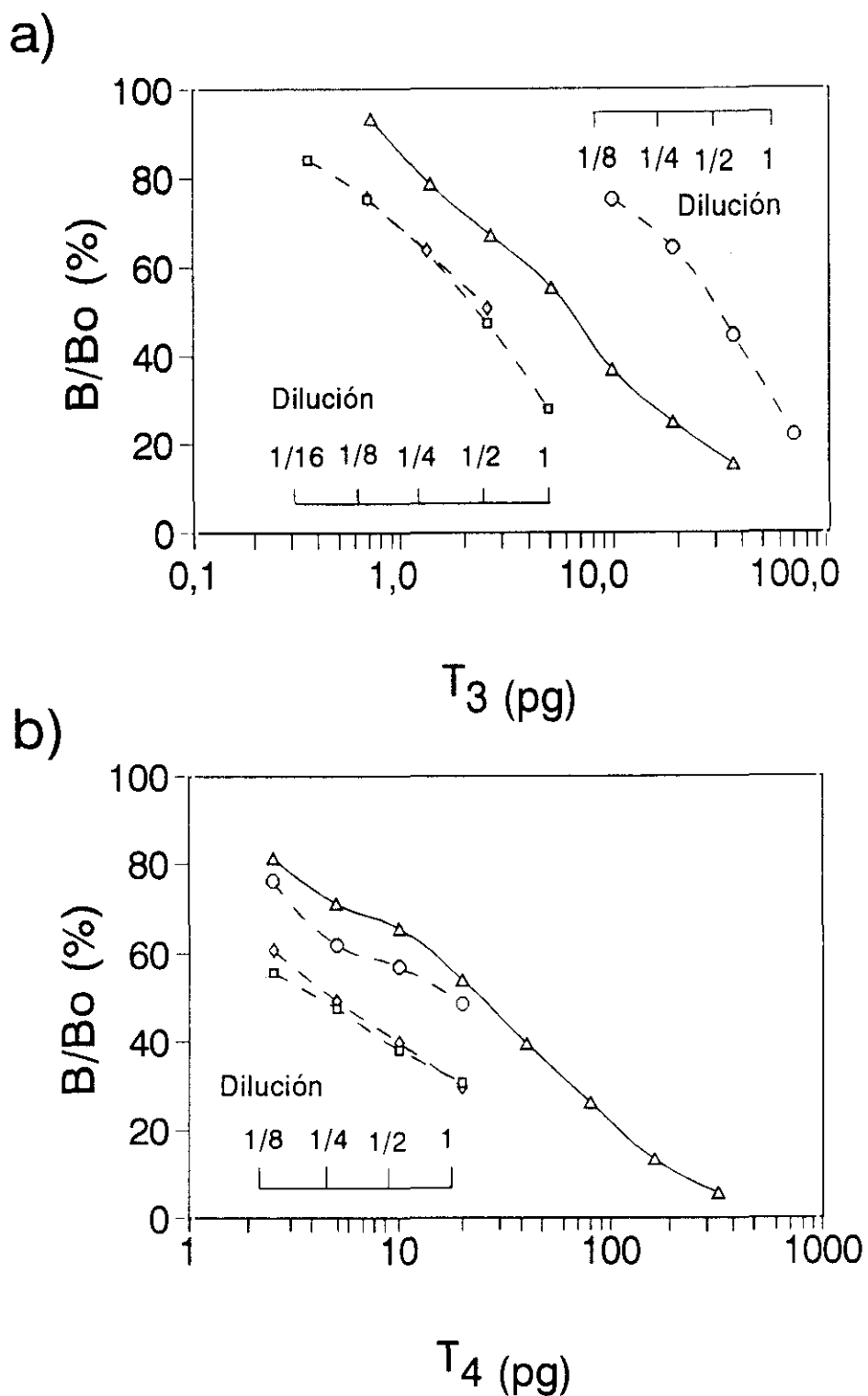
En el caso del medio de cultivo de tiroides procedentes de hembras adultas de *R. perezii*, se realizaron los RIAs directamente, sin previo procesamiento de las muestras. De nuevo se observa (Fig. 5) la existencia de un paralelismo significativo ( $p > 0,1$ ) entre las curvas estándares de HT y las diluciones del medio de cultivo de tiroides control ( $T_3$ ,  $b = -1,535 \pm 0,218$ ;  $T_4$ ,  $b = -1,905 \pm 0,131$ ).

**1.1.2. RECUPERACIÓN ANALÍTICA.**

Continuando con la validación de los RIAs de HT para muestras de *R. perezii*, se llevaron a cabo las pruebas necesarias para determinar la recuperación analítica. Para ello, se añadieron cantidades conocidas de  $T_3$  y  $T_4$  a distintas muestras (extractos de larvas y plasma, fracciones libre y unida de tiroides y medio de cultivo de tiroides), y la cantidad de hormona encontrada se comparó con la cantidad de hormona esperada.

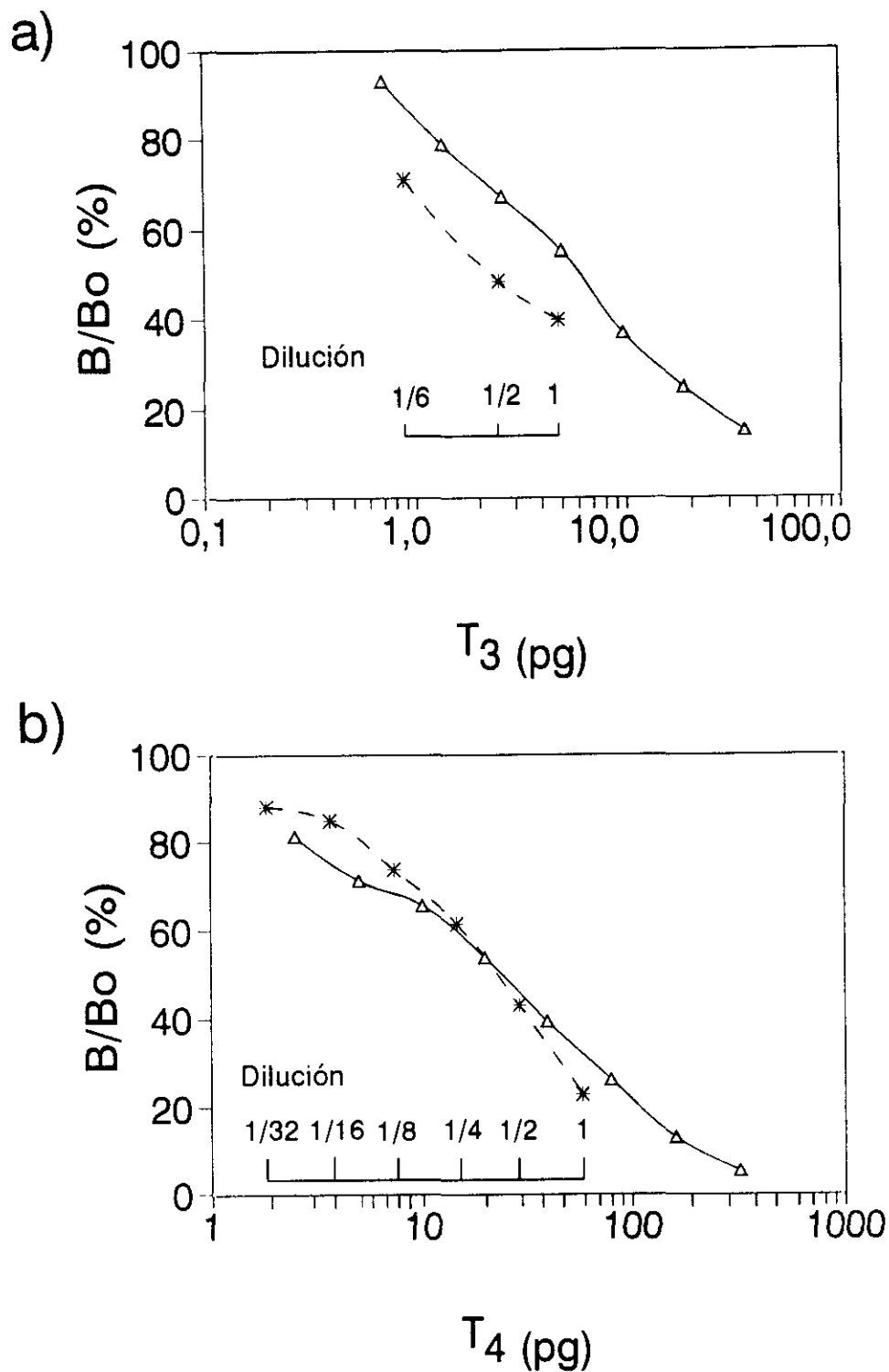


**Figura 3.** Paralelismos entre las curvas estándares ( $\Delta$ — $\Delta$ ) de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y diluciones sucesivas, realizadas en los tampones de los RIAs respectivos, de los extractos de larvas de *R. perezii* ( $\times$ -- $\times$ ). Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 4.** Paralelismos entre las curvas estándares ( $\Delta$ — $\Delta$ ) de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y diluciones sucesivas, realizadas en los tampones de los RIAs respectivos, de los extractos de plasma ( $\diamond$ -- $\diamond$ ) y de las fracciones tiroideas libres ( $\square$ -- $\square$ ) y unidas ( $\bullet$ -- $\bullet$ ) de adultos de *R. perezii*. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m.  $< 5\%$  de la  $\bar{x}$ ).





**Figura 5.** Paralelismos entre las curvas estándares ( $\Delta$ — $\Delta$ ) de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y diluciones sucesivas, realizadas en los tampones de los RIAs respectivos, de medio de cultivo de tiroides (\*--\*) de adultos de *R. perezii*. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).

**a) Larvas.**

Como se puede observar en la Figura 6, existe una correlación significativa tanto entre la cantidad de  $T_3$  esperada y la encontrada ( $r=0,979$ ,  $p<0,05$ ), como entre la cantidad de  $T_4$  esperada y la encontrada ( $r=0,995$ ,  $p<0,01$ ). Las pendientes de las rectas de regresión son próximas a 1 en los dos casos ( $T_3$ ,  $b=1,35 \pm 0,19$ ;  $T_4$ ,  $b=0,89 \pm 0,05$ ), lo cual indica una relación de 1 a 1 entre las HT esperadas y las estimadas en el ensayo.

**b) Plasma.**

En el caso del plasma de adultos de *R. perezii* (Fig. 7), también se observa una correlación significativa ( $r=0,998$ ,  $p<0,005$ ) entre la cantidad de  $T_3$  esperada y la estimada mediante RIA, siendo la relación entre ellas de 1 a 1 ( $b=1,12 \pm 0,04$ ). Resultados similares se observaron en el caso de la  $T_4$  ( $r=0,995$ ,  $p<0,01$ ;  $b=0,87 \pm 0,05$ ).

**c) Tiroides.**

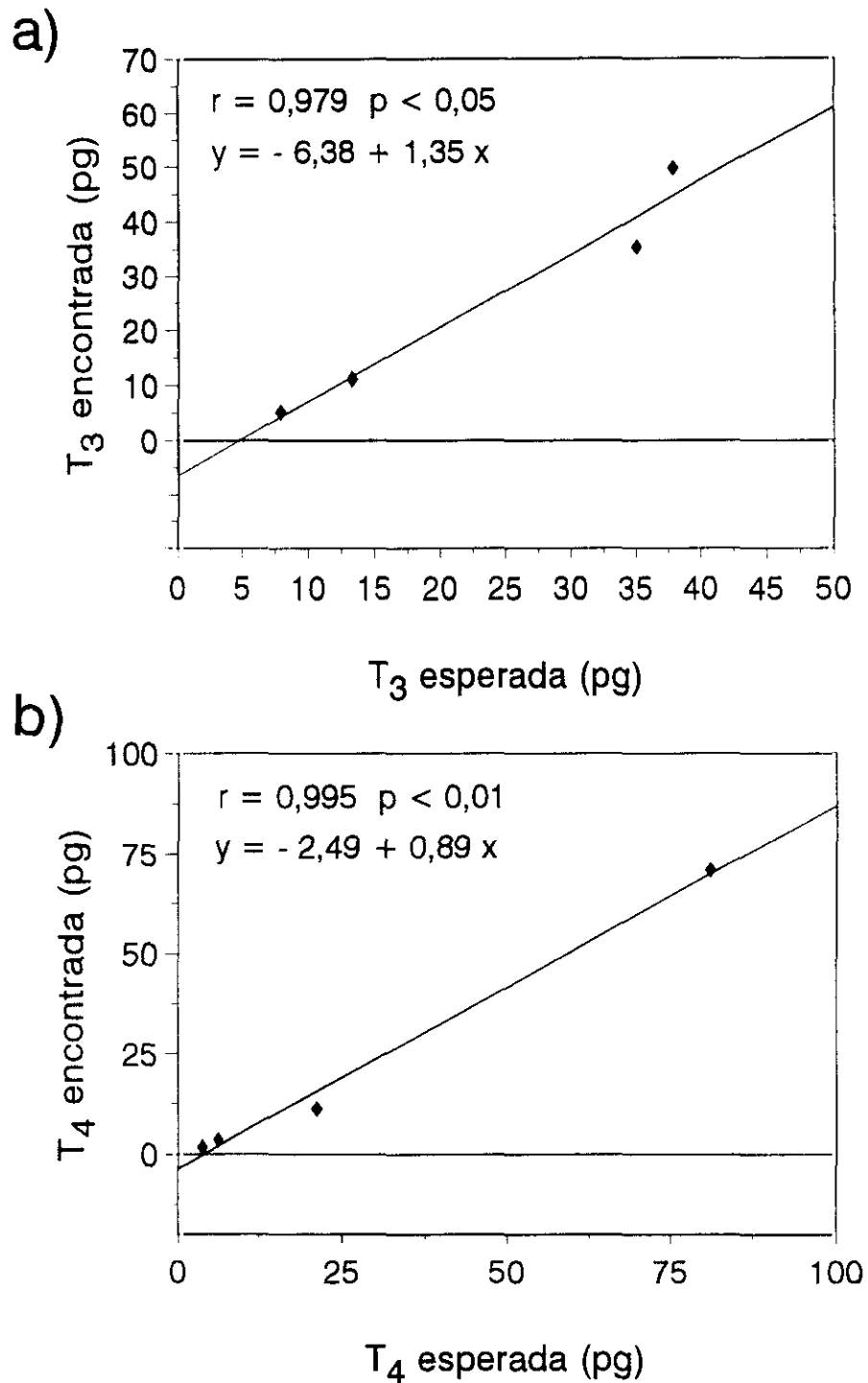
Las fracciones libres (F) de HT (Fig. 8) presentaron una correlación significativa entre las cantidades de HT esperadas y encontradas ( $T_3$ ,  $r=0,991$ ,  $p<0,01$ ;  $T_4$ ,  $r=0,999$ ,  $p<0,0005$ ). De manera similar, en el caso de las fracciones unidas de HT (Fig. 9), se apreció la existencia de correlaciones significativas ( $T_3$ ,  $r=0,999$ ,  $p<0,025$ ;  $T_4$ ,  $r=0,998$ ,  $p<0,001$ ). Las relaciones entre las hormonas esperadas y las estimadas en el RIA fueron aproximadamente de 1 a 1 en todos los casos ( $FT_3$ ,  $b=1,12 \pm 0,11$ ;  $FT_4$ ,  $b=0,83 \pm 0,02$ ;  $BT_3$ ,  $b=1,09 \pm 0,05$ ;  $BT_4$ ,  $b=1,03 \pm 0,03$ ).

**d) Medio de cultivo.**

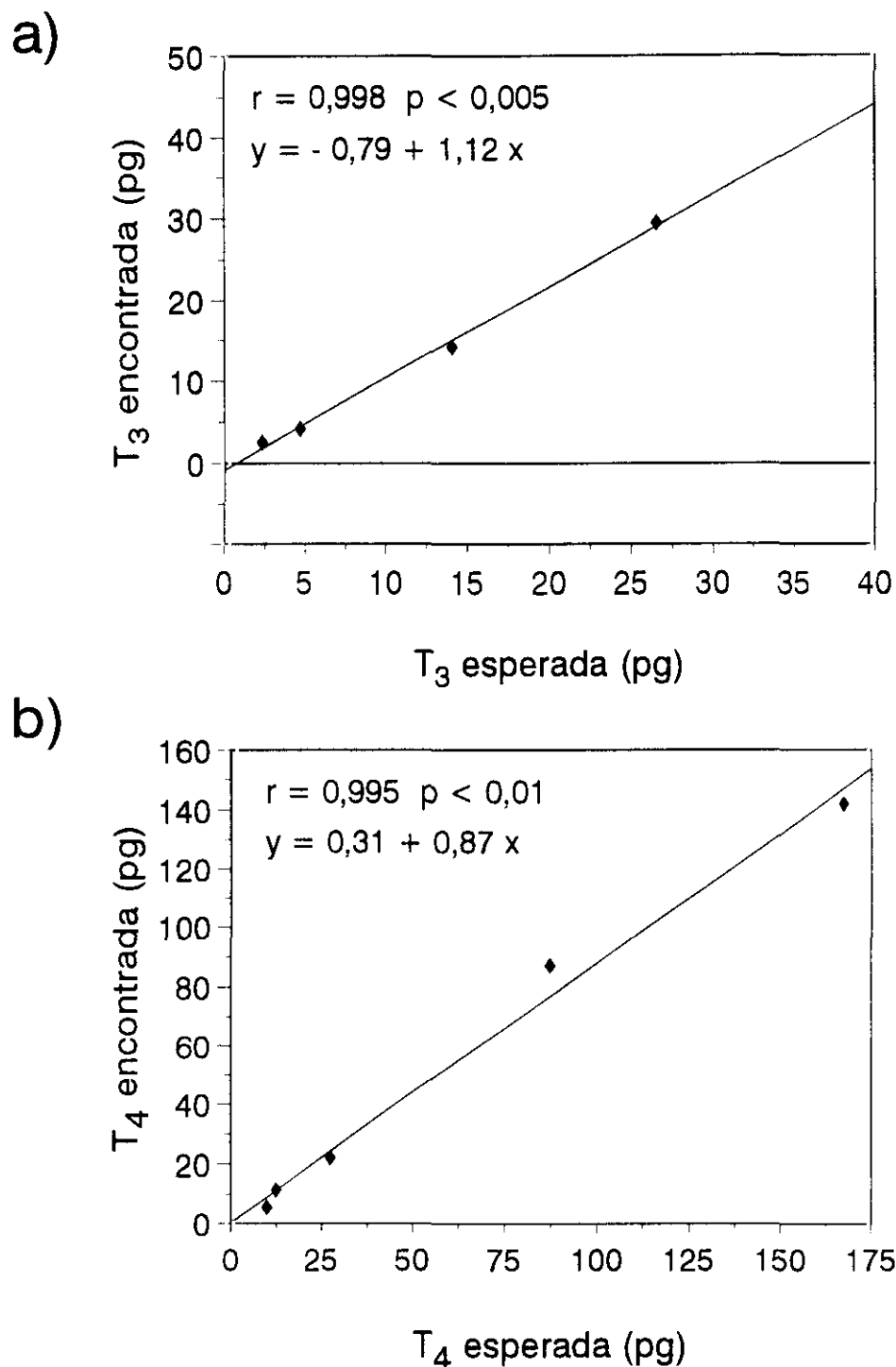
Finalmente, se mantuvo la correlación significativa ( $r=0,997$ ,  $p<0,05$ ) entre la  $T_3$  esperada y la determinada mediante RIA en los medios de cultivo procedentes de tiroides (Fig. 10), así como entre los valores esperados y encontrados de  $T_4$  ( $r=0,996$ ,  $p<0,01$ ). Las pendientes de las rectas de regresión fueron ligeramente superiores a 1 ( $T_3$ ,  $b=1,32 \pm 0,10$ ;  $T_4$ ,  $b=1,53 \pm 0,11$ ).

**1.1.3. PRECISIÓN Y REPRODUCIBILIDAD.**

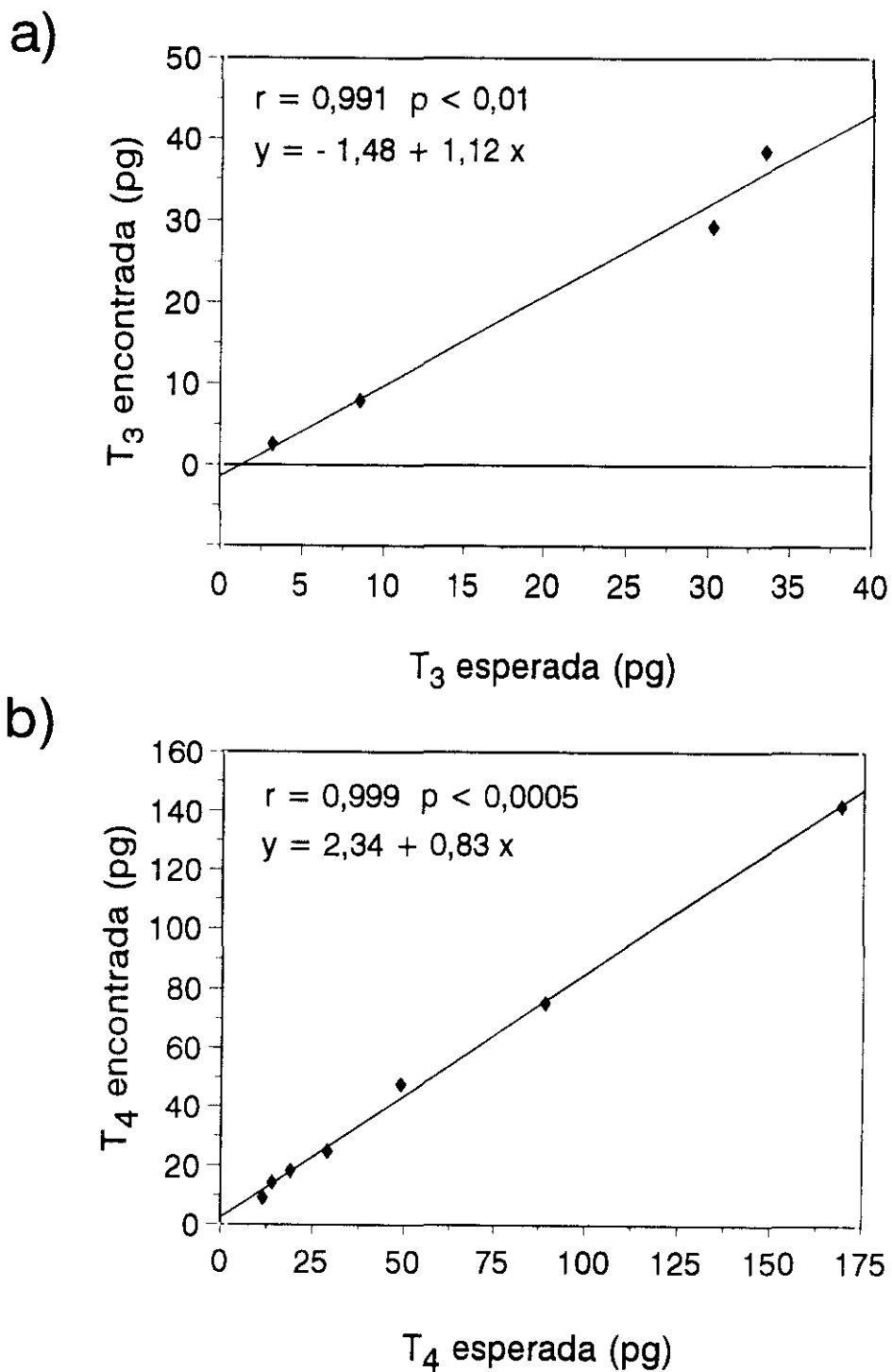
Por último, se muestran los resultados obtenidos en la determinación de los límites de detección de los RIAs y los coeficientes de variación intra- e interensayo.



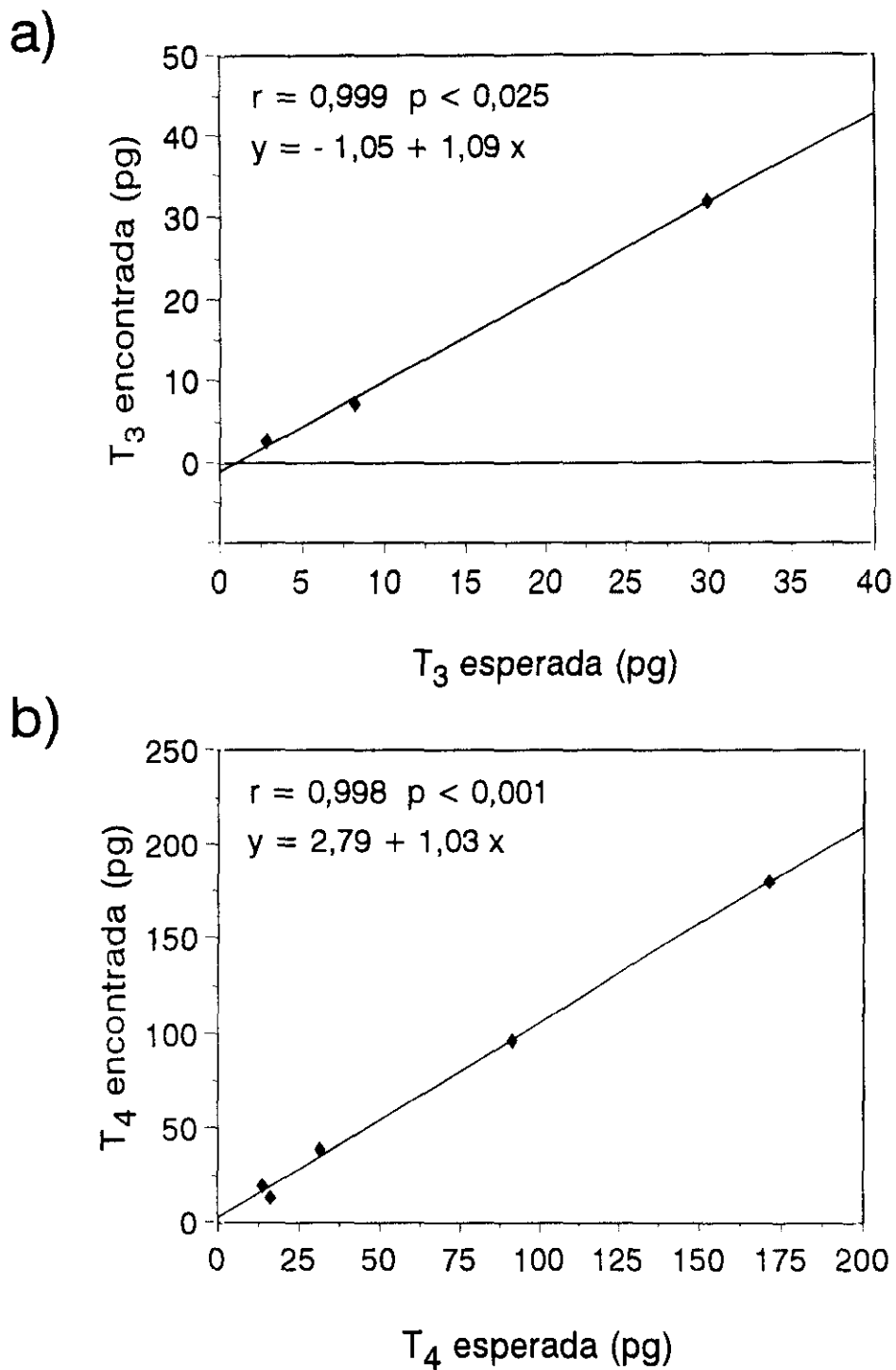
**Figura 6.** Eficacia analítica de los RIAs de a)  $T_3$  y b)  $T_4$ . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos de larvas de *R. perezi*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



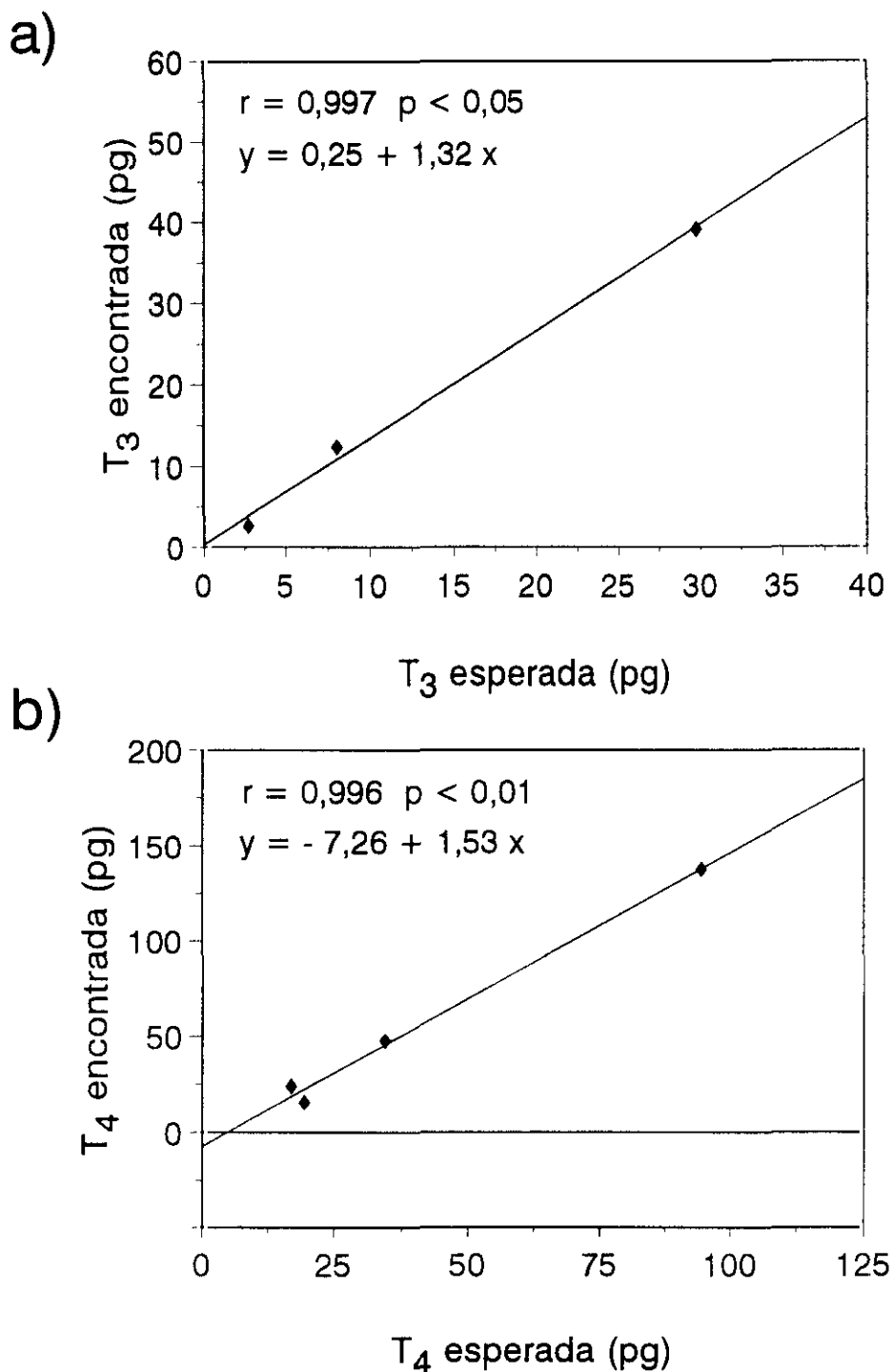
**Figura 7.** Eficacia analítica de los RIAs de a)  $T_3$  y b)  $T_4$ . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos de plasma de adultos de *R. perezii*, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 8.** Eficacia analítica de los RIAs de a)  $T_3$  y b)  $T_4$ . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en la fracción libre de tiroides de adultos de *R. perezii*, a la que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 9.** Eficacia analítica de los RIAs de a)  $T_3$  y b)  $T_4$ . Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en la fracción unida de tiroides de adultos de *R. perezii*, a la que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 10.** Eficacia analítica de los RIAs de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub>. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en medio de cultivo de tiroides de adultos de *R. perezii*, al que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).

**a) Límites de detección.**

Los límites de detección de los RIAs de HT fueron de 0,78 pg para T<sub>3</sub> y de 1,50 pg para T<sub>4</sub>. En cuanto a la unión específica máxima (Bo) de los RIAs de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub>, se mantuvo en un intervalo de 31,07-49,38 % y de 34,7-47,21 %, respectivamente. La unión inespecífica (NSB) fue alrededor del 10-14 % (T<sub>3</sub>, 14,27 ± 0,35; T<sub>4</sub>, 10,21 ± 0,39; n=10).

**b) Variación intra- e interensayo.**

Para calcular la variación intraensayo se utilizaron los coeficientes de variación (CV) de la unión específica (%) obtenidos para el Bo y para tres concentraciones distintas de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> correspondientes a los tramos alto, medio y bajo de las curvas estándares (T<sub>3</sub>, 1,56, 6,25, 25 pg/tubo; T<sub>4</sub>, 5, 20, 80 pg/tubo; n=9-10). En el caso de la variación interensayo se utilizaron los CV (%) de los mismos puntos estándares de las curvas procedentes de 10 ensayos realizados en diferentes días.

Los CV calculados a partir de las curvas estándares se compararon con los valores de los CV determinados a partir de muestras con un contenido medio de HT ( $\bar{x}$  pg) similar al de los puntos estándares seleccionados. Los resultados se muestran en la Tabla I.

Debido a la forma de las curvas estándares, el CV tiende a aumentar según incrementa la concentración de HT, ya que cuanto mayor es la concentración de hormona menor es la unión específica. En las valoraciones de HT realizadas en esta Memoria todas las muestras entraban en la parte central de la curva.

Lógicamente, como consecuencia de la mayor variabilidad de las muestras biológicas frente a la variación típica de los RIAs, los CV correspondientes a las muestras fueron superiores a los obtenidos a partir de las curvas estándares.

En resumen, tras la realización de las diversas pruebas citadas previamente, podemos concluir que los RIAs utilizados en los experimentos incluidos en esta Memoria son válidos para la estimación de HT en muestras de *R. perezii*.

**1.2. Validación de los RIAs de hormonas esteroides.**

Como hemos citado en la sección de Materiales y Métodos (2.7.2.), la validación para la estimación de E<sub>2</sub> y testosterona en algunas muestras (plasma y medio de cultivo) procedentes de *R. perezii*, ha sido realizada con anterioridad en este laboratorio. A continuación expondremos los resultados obtenidos en la validación de los RIAs de E<sub>2</sub> y T



**Tabla I.** Comparación de los coeficientes de variación intra- e interensayo de los RIAs de HT calculados a partir de las curvas estándares y a partir de muestras de *R. perezii*.

### T<sub>3</sub>

CV (%)	<u>Curva estándar</u>		<u>Larvas</u>		<u>Plasma</u>		<u>Tiroides libre</u>		<u>Tiroides unida</u>		<u>Medio</u>	
	<u>Intra-</u>	<u>Inter-</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>
Bo 0 pg	2,3	3,4	--		--		--		--		--	
1,56 pg	3,2	4,2	10,2	[1,3]	28,5	[1,1]	10,5	[1,6]	9,8	[1,8]	25,9	[1,8]
6,25 pg	8,5	9,2	18,8	[8,5]	33,7	[5,1]	24,7	[6,4]	32,6	[5,4]	--	--
25 pg	9,0	11,0	20,8	[12,1]	49,6	[24,5]	43,5	[25,9]	47,5	[17,2]	--	--

### T<sub>4</sub>

CV (%)	<u>Curva estándar</u>		<u>Larvas</u>		<u>Plasma</u>		<u>Tiroides libre</u>		<u>Tiroides unida</u>		<u>Medio</u>	
	<u>Intra-</u>	<u>Inter-</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>	<u>CV</u>	<u>[<math>\bar{x}</math>]</u>
Bo 0 pg	3,1	5,1	--		--		--		--		--	
5 pg	3,9	5,9	28,4	[11,4]	15,9	[5,0]	9,8	[6,0]	11,7	[5,9]	41,1	[3,0]
20 pg	4,0	6,1	30,6	[26,2]	21,2	[16,2]	15,2	[18,3]	14,9	[20,1]	46,7	[19,4]
80 pg	5,9	10,9	39,1	[125,5]	22,5	[83,6]	29,6	[68,3]	20,1	[72,9]	--	--

en larvas de *R. perezii*, así como los de la validación del RIA de progesterona en medio de cultivo de ovocitos de individuos adultos de esta especie.

### **1.2.1. VALORACIÓN DE ESTRADIOL Y TESTOSTERONA EN LARVAS.**

De forma similar a lo descrito para las HT, se realizaron pruebas tanto del paralelismo como de la recuperación analítica.

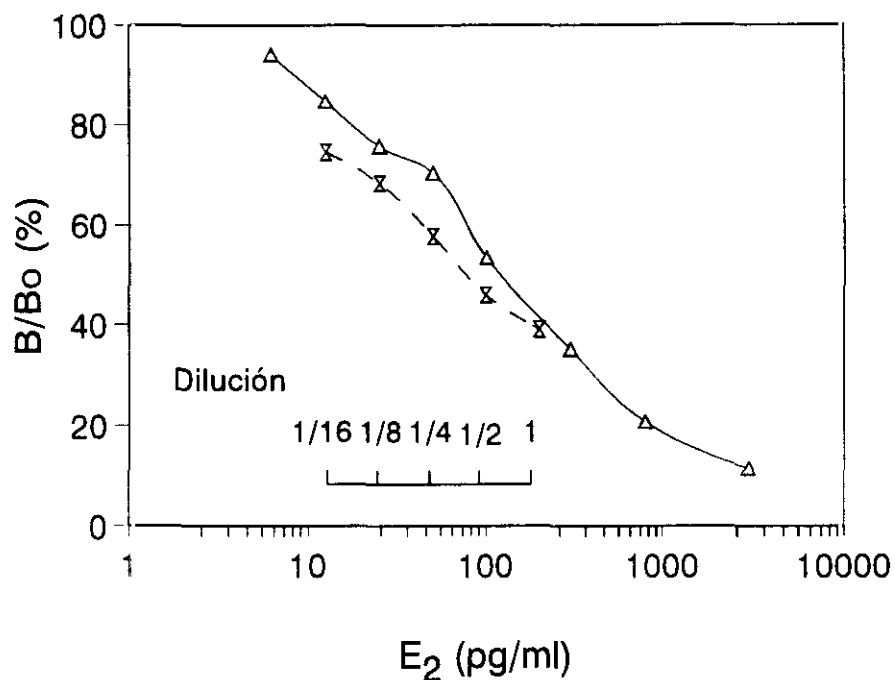
En la Figura 11a, se muestra el paralelismo entre las diluciones de las muestras ( $b = -1,168 \pm 0,058$ ) y la curva estándar de  $E_2$  ( $b = -1,561 \pm 0,075$ ), no existiendo diferencias significativas entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación logit-log de los datos ( $p > 0,05$ ). La recuperación analítica (Fig. 11b) nos indica la aparición de una correlación significativa entre la cantidad de  $E_2$  esperada y la encontrada ( $r = 0,992$ ,  $p < 0,01$ ) siendo la relación aproximadamente del tipo 1 a 1 ( $b = 1,34 \pm 0,12$ ).

Resultados análogos se obtuvieron en el caso de la valoración de testosterona (Fig. 12), de manera que, una vez transformados los datos, no aparecen diferencias significativas ( $p > 0,1$ ) entre las pendientes (Fig. 12a) de las rectas (estándar,  $b = -1,489 \pm 0,048$ ; diluciones,  $b = -1,414 \pm 0,064$ ), siendo significativa ( $r = 0,999$ ,  $p < 0,01$ ) la correlación entre la testosterona esperada y la estimada por RIA (Fig. 12b). En este caso la relación que viene dada por la pendiente de la recta fue superior a 1 ( $b = 1,76 \pm 0,04$ ), probablemente debido a la reacción cruzada del anticuerpo con la 5-dihidrotestosterona (7,2%), ya que en muchos anfibios este esteroide es muy abundante, incluso en hembras.

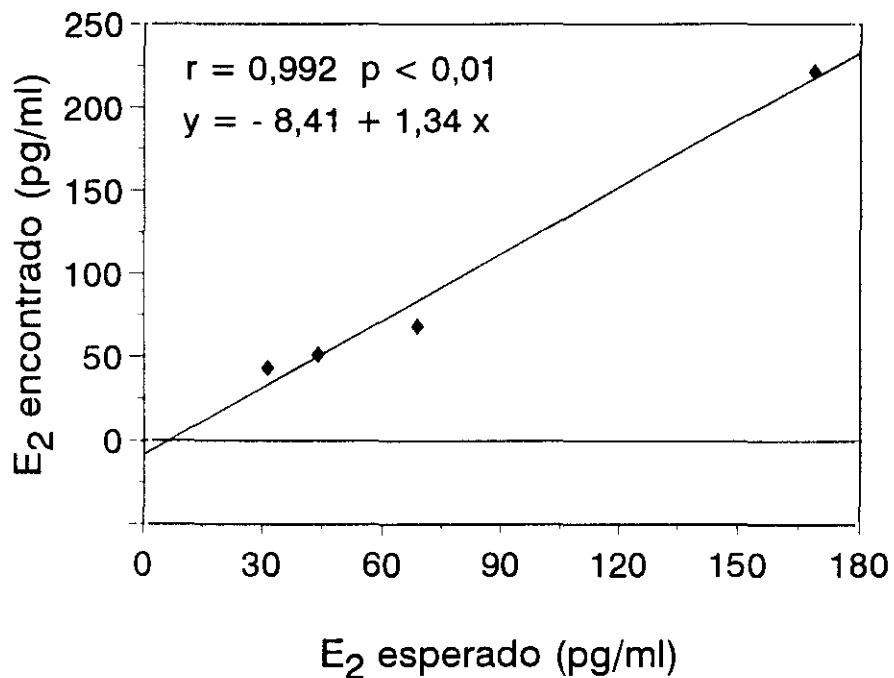
### **1.2.2. VALORACIÓN DE PROGESTERONA EN MEDIO DE CULTIVO.**

También en el caso del RIA directo de progesterona (P) en medio de cultivo de ovocitos se observó la existencia de paralelismo (Fig. 13a), al no encontrarse diferencias significativas ( $p > 0,05$ ) entre las pendientes de las rectas obtenidas tras la transformación de los datos (estándar,  $b = -1,408 \pm 0,079$ ; diluciones,  $b = -2,121 \pm 0,343$ ). Existe una correlación significativa ( $r = 0,999$ ,  $p < 0,05$ ) entre la cantidad de P esperada y la encontrada (Fig. 13b) aunque la relación también resultó ser superior a 1 ( $b = 1,64 \pm 0,05$ ) lo que podría deberse a una posible interferencia de otros esteroides presentes en el medio de cultivo.

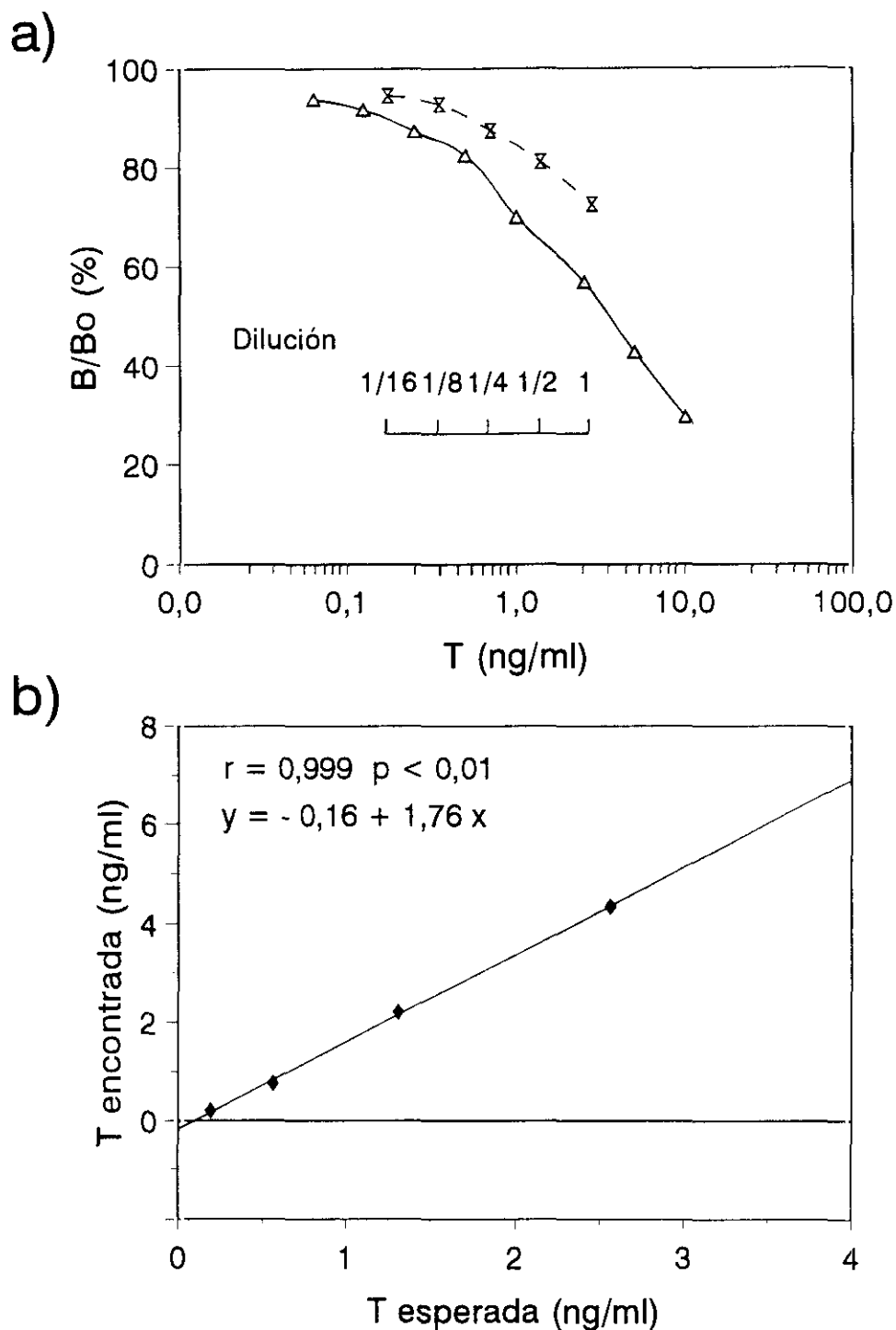
a)



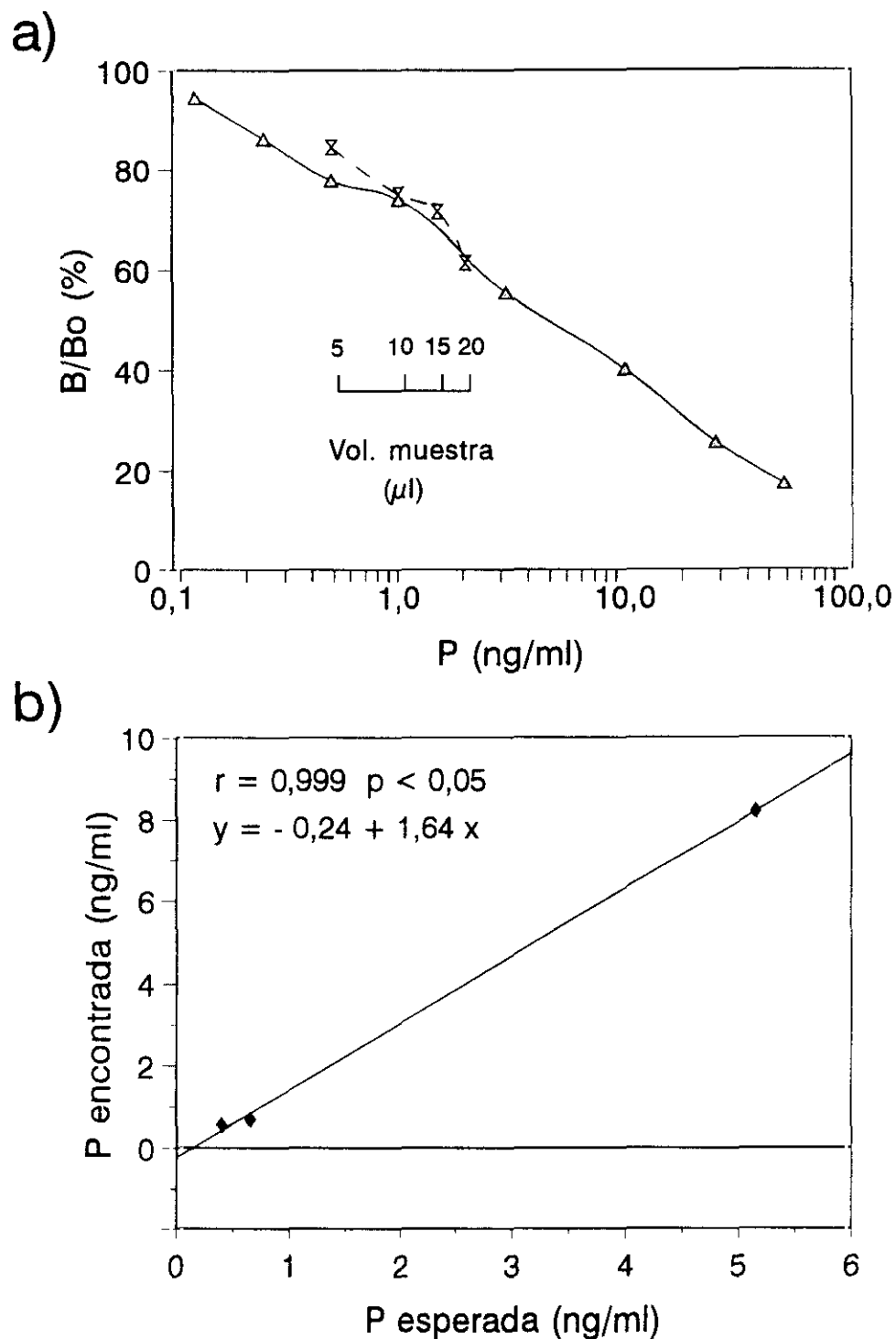
b)



**Figura 11.** a) Paralelismo entre la curva estándar de E<sub>2</sub> y diluciones sucesivas, realizadas en tampón del RIA, de extractos de larvas de *R. perezii*. b) Eficacia analítica del RIA de E<sub>2</sub>. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos de larvas, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 12.** a) Paralelismo entre la curva estándar de T y diluciones sucesivas, realizadas en tampón del RIA, de extractos de larvas de *R. perezii*. b) Eficacia analítica del RIA de T. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en extractos de larvas, a los que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).



**Figura 13.** a) Paralelismo entre la curva estándar de P y diluciones sucesivas, realizadas en tampón del RIA, de medio de cultivo de ovocitos de adultos de *R. perezii*. b) Eficacia analítica del RIA de Po. Regresión lineal entre la cantidad de hormona esperada en medio de cultivo, al que se había añadido una cantidad de hormona conocida, y la cantidad de hormona estimada mediante RIA. Los datos se representan como la media de dos determinaciones (e.e.m. < 5% de la  $\bar{x}$ ).

## 2. ONTOGENIA DE LOS CICLOS DIARIOS DE HORMONAS TIROIDEAS EN *R. perezii*.

Los estados de desarrollo utilizados, así como el número de individuos (ind./tubo) que constituían cada muestra (n) para los RIAs de HT, se presentan en la Tabla II.

**Tabla II.** Estados de desarrollo de *R. perezii* utilizados para el estudio de la evolución ontogénica de los cambios día/noche de la actividad tiroidea.

Fecundación	Estado		Peso ind. (mg)	RIAs de HT	
			( $\bar{x} \pm e.e.m.$ )	(n)	(ind./tubo)
In vitro	(G) 21-22	(TK) --	3,7 $\pm$ 0,24	4	30
Espontánea	25	--	12,2 $\pm$ 0,35	4	20
Espontánea	26-27	I-II	70,6 $\pm$ 1,4	10	4
Espontánea	40	XV-XVI	438,4 $\pm$ 8,6	12	1
Espontánea	45-46	XXIV-XXV	327,0 $\pm$ 19,0	8	1

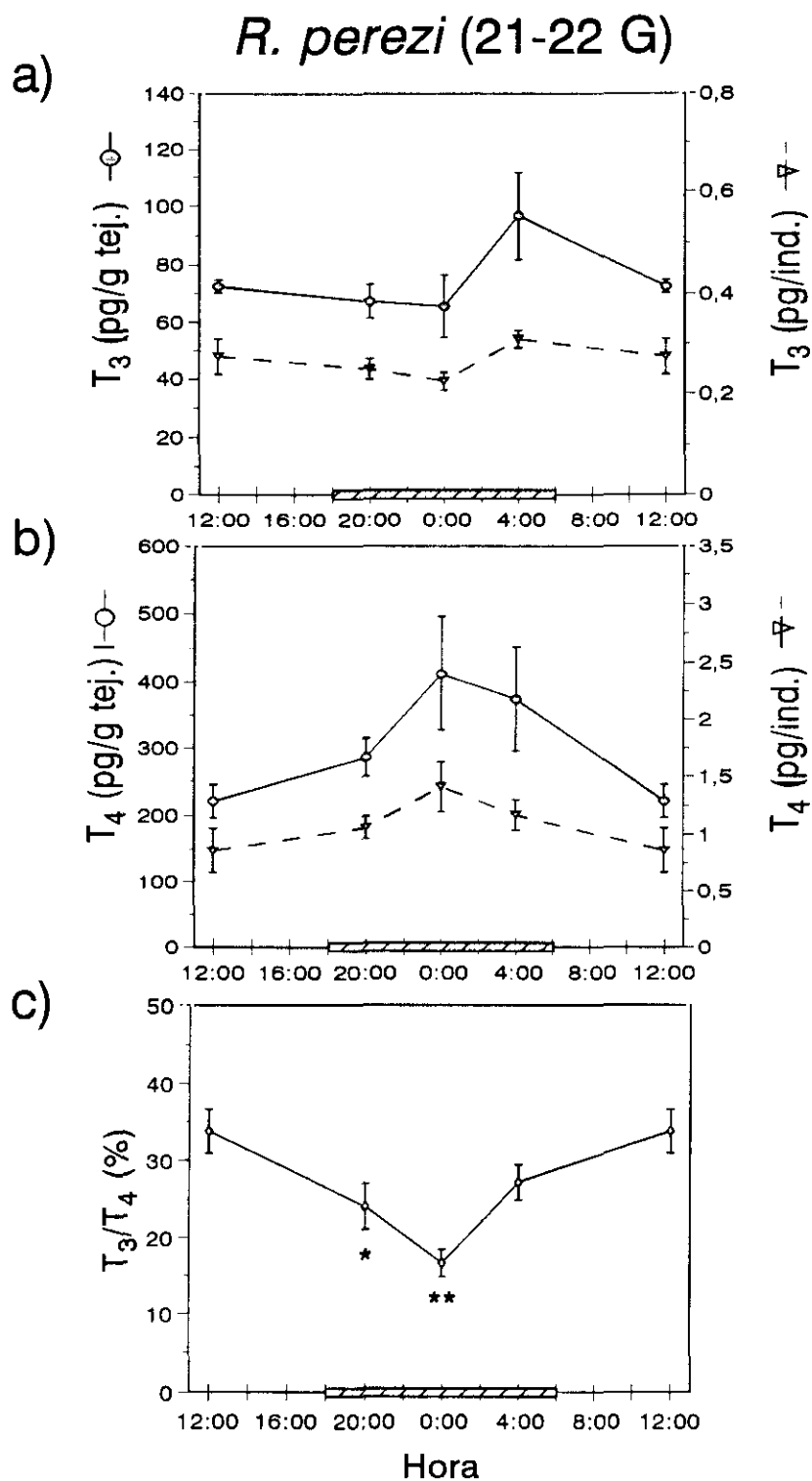
Los estados de *R. perezii* están referidos a la tabla de Gosner, 1960 (G) y a la tabla de Taylor y Kollros, 1946 (TK).

En las Fig. 14 y 15 están representados los datos obtenidos en embriones de *R. perezii* en el momento de la eclosión (21-22 G) y del inicio de la alimentación (25 G). No aparecen cambios diarios en la concentración y contenido total de HT (Fig. 14a,b y 15a,b) aunque se aprecia un descenso nocturno de la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 14c y 15c).

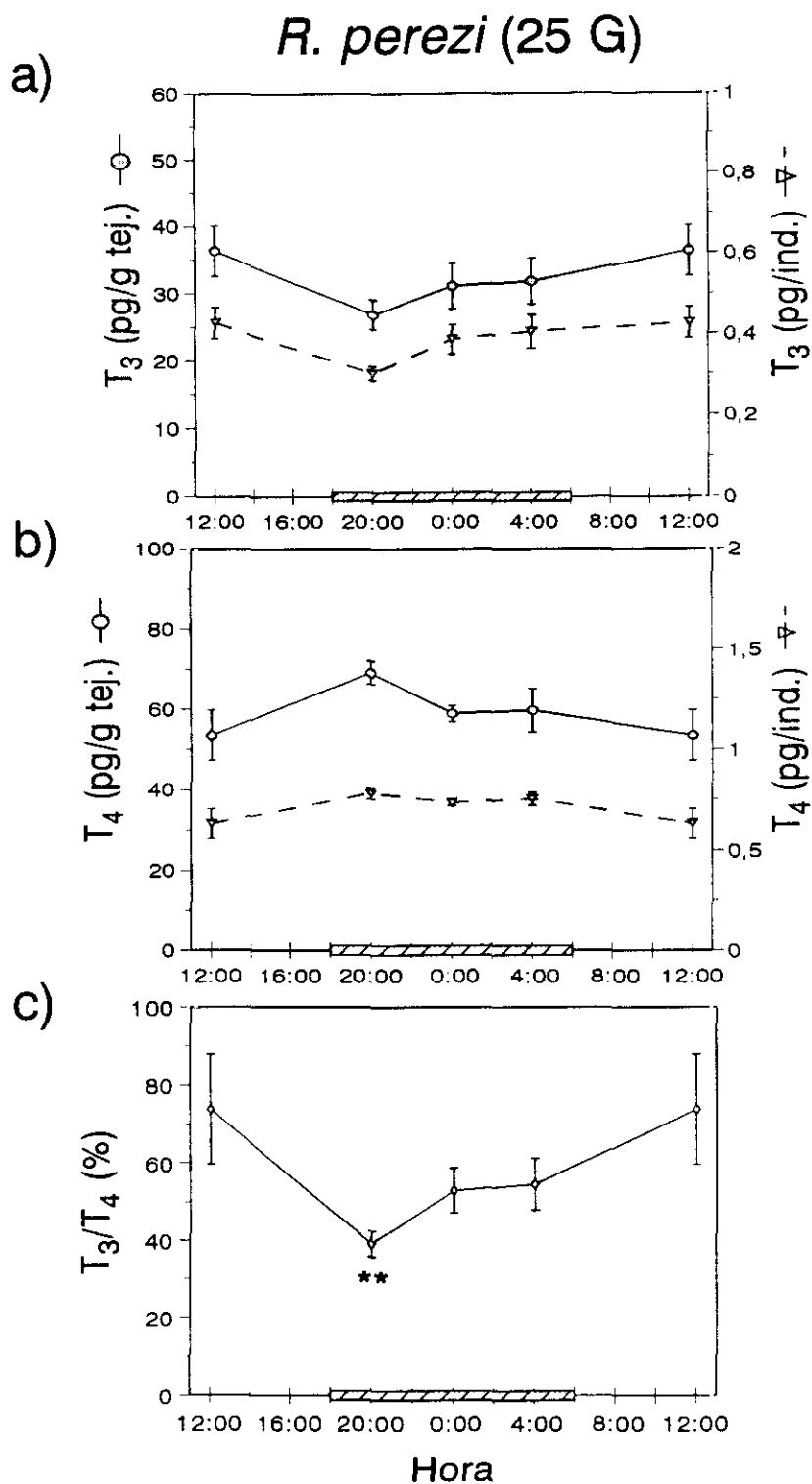
Los primeros cambios diarios significativos, tanto de la concentración como del contenido total de HT (Fig. 16), se observan en larvas premetamórficas (I-II TK), mostrando valores nocturnos más altos de  $T_3$  (Fig. 16a) y  $T_4$  (Fig. 16b). Sin embargo, la relación  $T_3/T_4$  disminuye durante la noche (Fig. 16c).

En prometamorfosis (XV-XVI TK) desaparecen los cambios en  $T_3$  (Fig. 17a) y se invierten los cambios en  $T_4$  (Fig. 17b), de manera que, tanto la concentración como el contenido total de  $T_4$ , es menor al principio y al final de la fase oscura ( $p < 0,01$ ). En cuanto a la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 17c), se eleva en estos dos puntos con respecto al valor diurno.

La Fig. 18 muestra los resultados obtenidos al final del clímax metamórfico (XXIV-XXV TK), observándose una tendencia similar a la observada en la premetamorfosis, con valores de HT medios más elevados durante la noche, pero que no difieren significativamente de los valores diurnos.

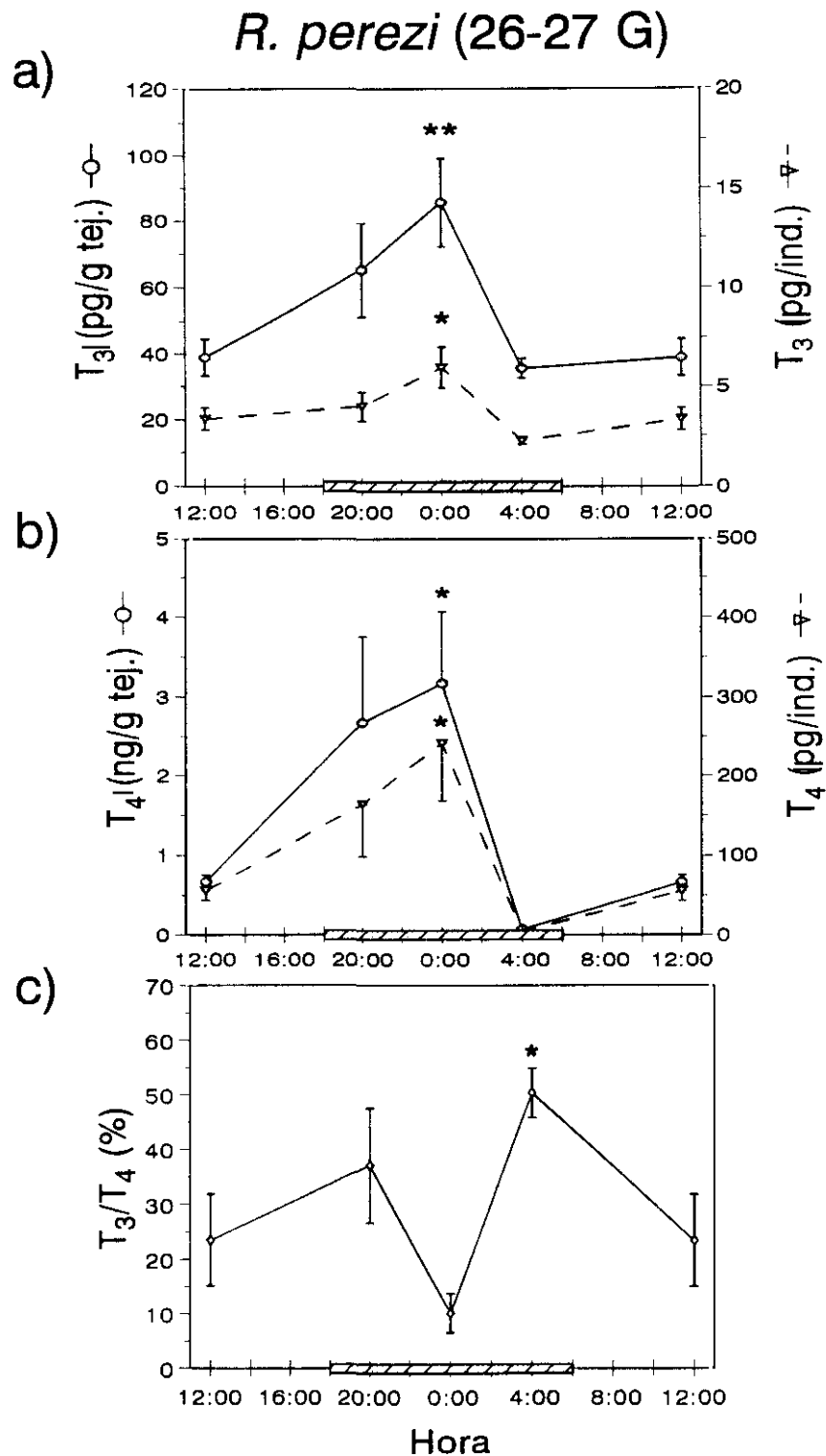


**Figura 14.** Cambios día/noche de la concentración y el contenido total de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) de la relación  $T_3/T_4$  en embriones de *R. perezii* en el momento de la eclosión (21-22 G). Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=4$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto a los valores diurnos. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario.

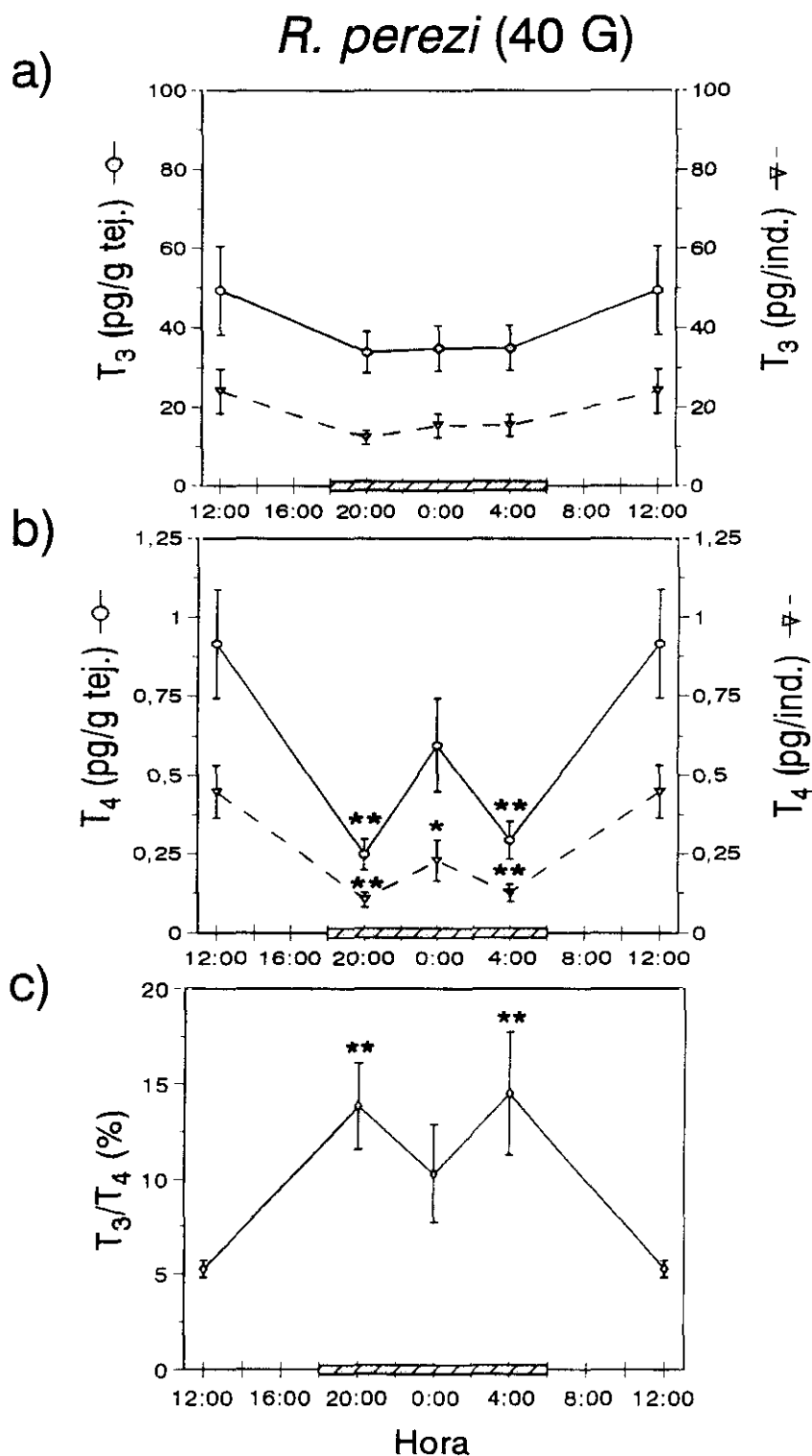


**Figura 15.** Cambios día/noche de la concentración y el contenido total de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub> y c) de la relación T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> en embriones de *R. perezii* al inicio de la alimentación (25 G). Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=4). \* p<0,05 respecto a los valores diurnos. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario.

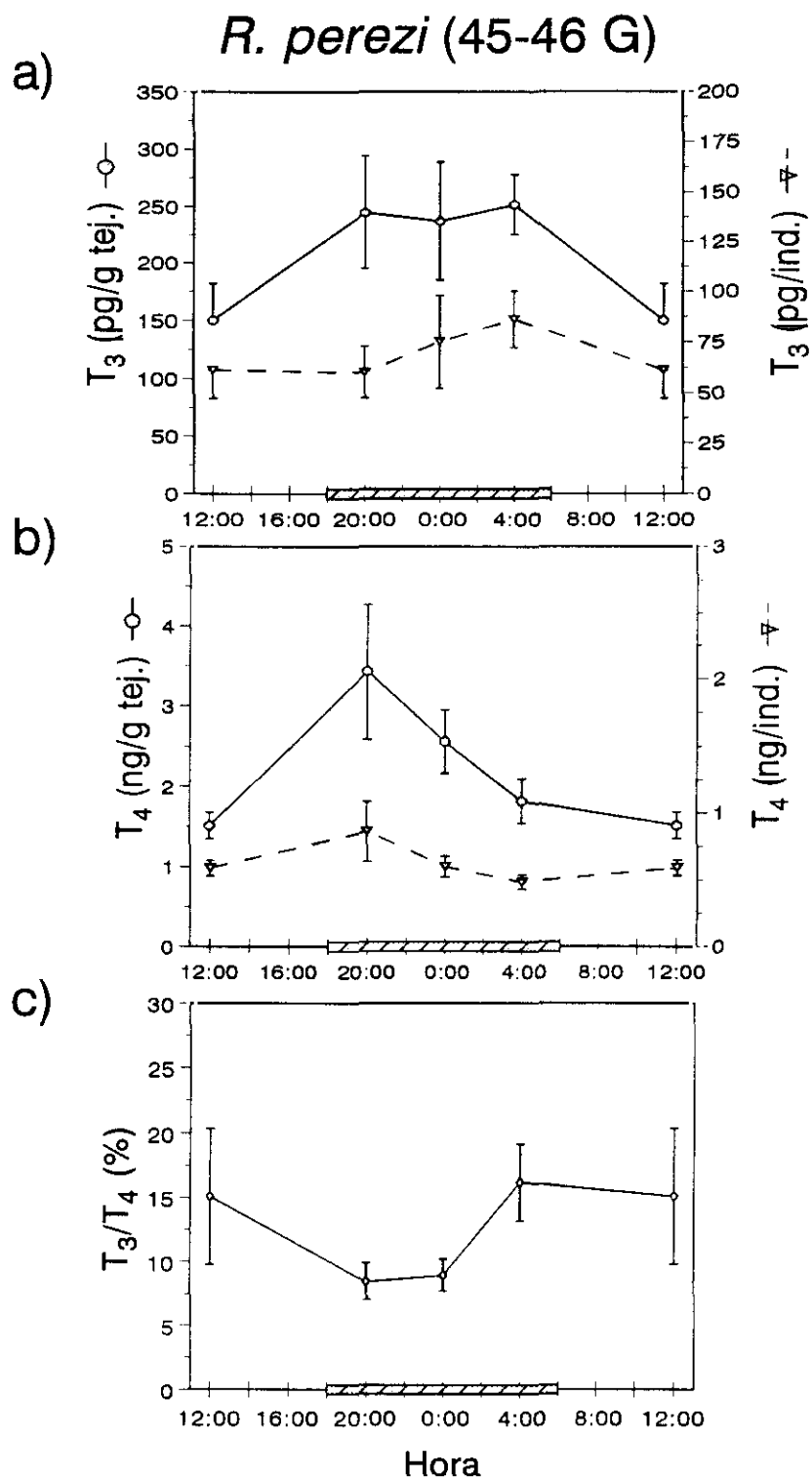




**Figura 16.** Cambios día/noche de la concentración y el contenido total de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) de la relación  $T_3/T_4$  en larvas premetamórficas de *R. perezii* (26-27 G). Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=10$ ). \*  $p<0,05$ ; \*\*  $p<0,01$  respecto a los valores diurnos. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario.



**Figura 17.** Cambios día/noche de la concentración y el contenido total de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) de la relación  $T_3/T_4$  en larvas prometamórficas de *R. perezii* (40 G). Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=12$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto a los valores diurnos. La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario.



**Figura 18.** Cambios día/noche de la concentración y el contenido total de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) de la relación  $T_3/T_4$  en larvas de *R. perezii* al final del clímax (45-46 G). Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=8$ ). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario.

Con relación a la evolución de la concentración y el contenido total de HT a lo largo del desarrollo de *R. perezii*, nuestros resultados indican la existencia de  $T_3$  y  $T_4$  en los estados embrionarios (21-22 G y 25 G). En general, como era de esperar, se observa una tendencia al incremento tanto del contenido total (Fig. 19a,b) como de la concentración de HT (Fig. 20a,b) a lo largo del desarrollo, observándose, debido a los cambios día/noche que acabamos de describir, un perfil diferente en estos dos momentos del fotociclo diario, así como un descenso aparente de la concentración de HT en prometamorfosis con relación al estado anterior debido al marcado aumento de peso (Fig. 21). La relación  $T_3/T_4$  (Fig. 19c) alcanza el valor más alto en el estado 25 G y disminuye posteriormente, observándose al final del clímax un cierto aumento durante el día.

### 3. CICLOS DIARIOS Y ESTACIONALES DE HORMONAS TIROIDEAS EN INDIVIDUOS ADULTOS DE *R. perezii*.

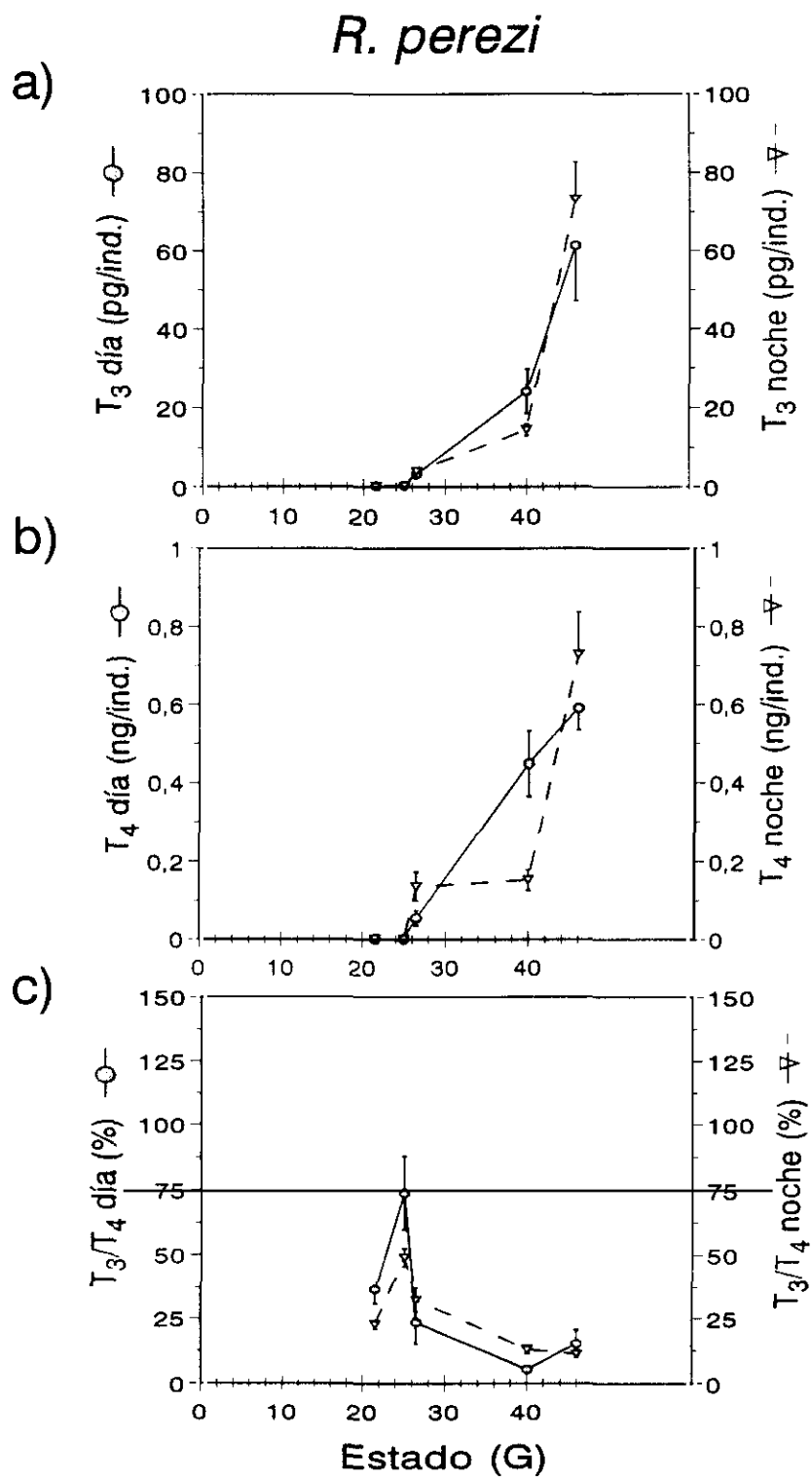
#### 3.1. Ciclos diarios.

La evolución estacional de los cambios diarios de la actividad tiroidea en individuos adultos de *R. perezii* fue evaluada mediante el estudio de los niveles plasmáticos y del contenido tiroideo (fracciones libre y unida a Tg) de HT en las cuatro estaciones del año.

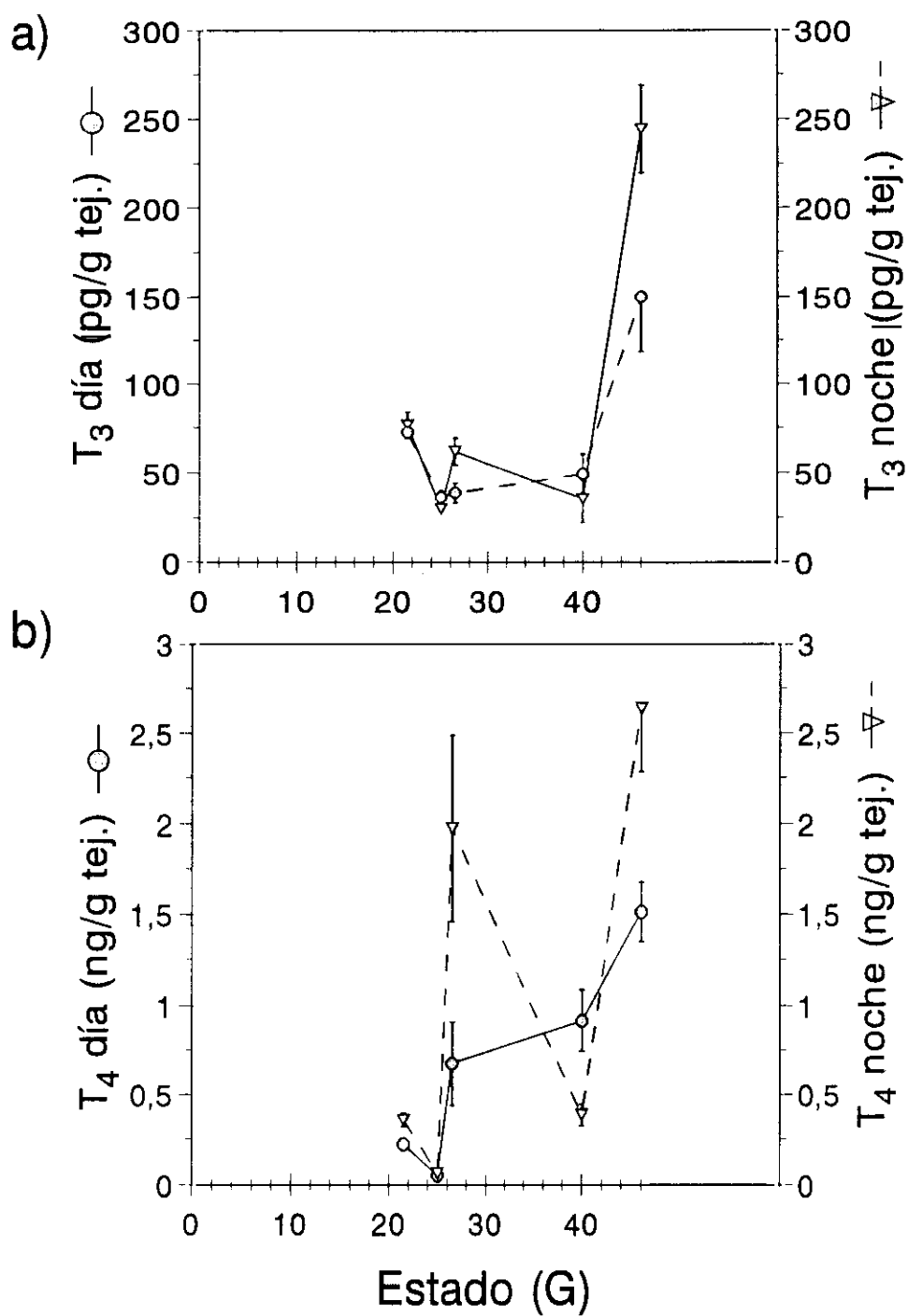
La Fig. 22 muestra los valores plasmáticos de  $T_3$  en las cuatro estaciones del año. Podemos observar que en primavera aparece un ciclo diario significativo (ANOVA1,  $p < 0,01$ ) con valores altos durante la fase de luz y valores bajos hacia la mitad de la fase oscura del fotociclo diario. La ciclicidad de los niveles circulantes de  $T_3$  sigue siendo significativa (ANOVA1,  $p < 0,05$ ) tanto en verano como en otoño mostrando una tendencia similar a la observada en primavera, sin embargo no se detecta en invierno.

Los niveles plasmáticos de  $T_4$  (Fig. 23) también presentaron cambios día/noche significativos (ANOVA1,  $p < 0,01$ ) en primavera con valores inferiores a los diurnos desde la mitad hasta el final de la fase oscura. Por el contrario, no se observaron cambios diarios significativos en otoño e invierno.

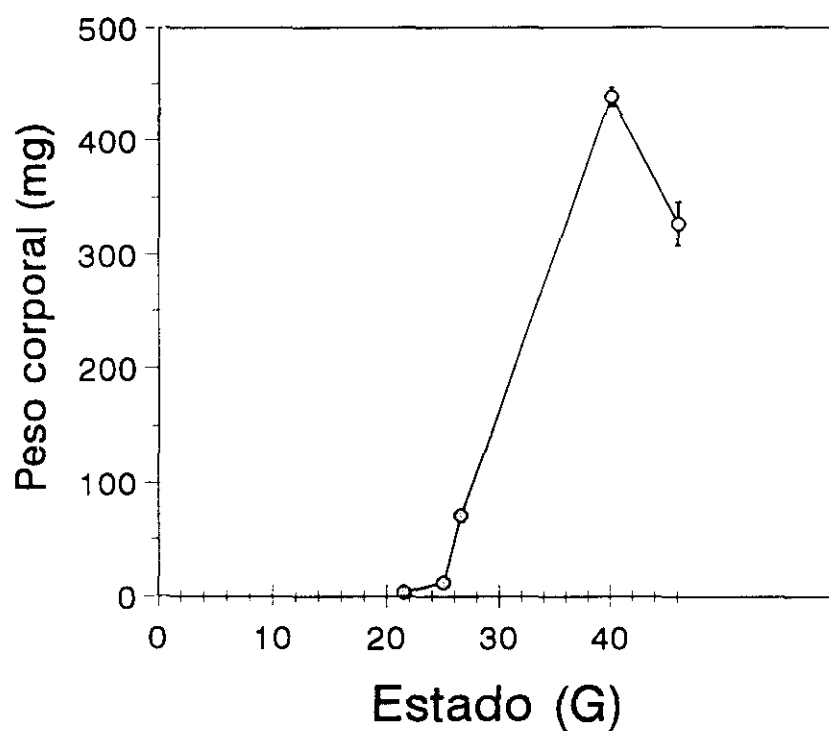
La proporción  $T_3/T_4$  plasmática (Fig. 24) no cambió significativamente a lo largo del día en ninguna de las cuatro estaciones.



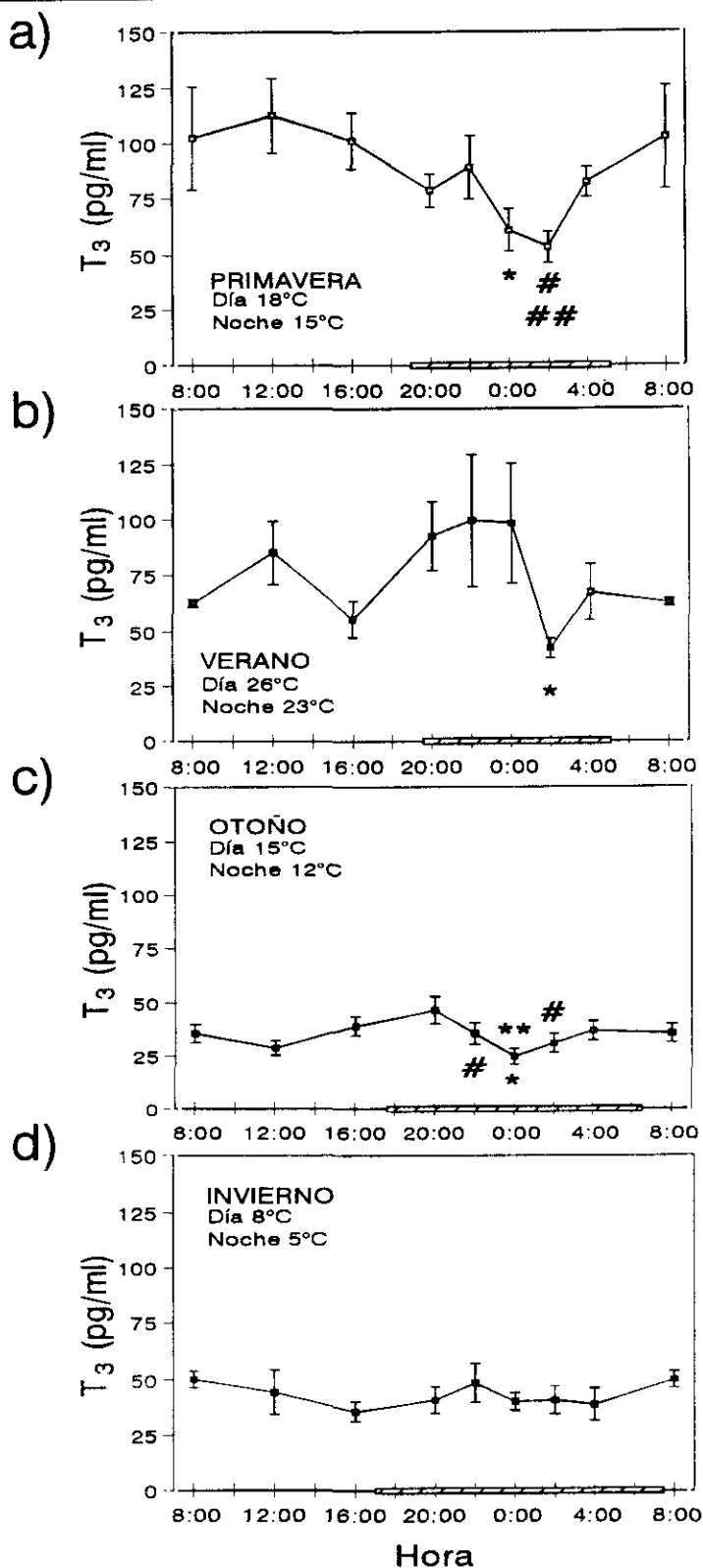
**Figura 19.** Evolución a lo largo de la ontogenia de *R. perezii* del contenido total de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) de la relación  $T_3/T_4$  diurnos y nocturnos. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. ( $n=4-36$ ).

*R. perezii*

**Figura 20.** Evolución a lo largo de la ontogenia de *R. perezii* de la concentración de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub> diurna y nocturna. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=4-36)

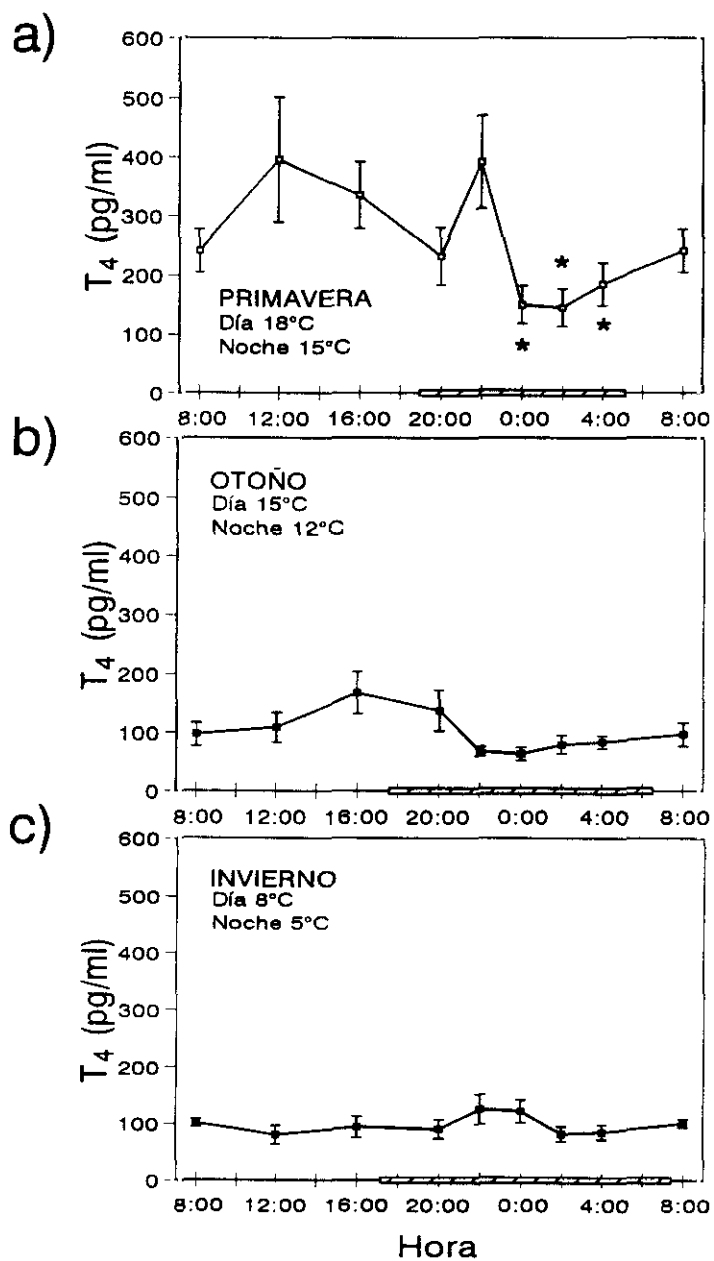


**Figura 21.** Evolución del peso corporal a lo largo de la ontogenia de *R. perezii*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  ( $n=16-48$  muestras de 1-30 ind., véase Tabla II).

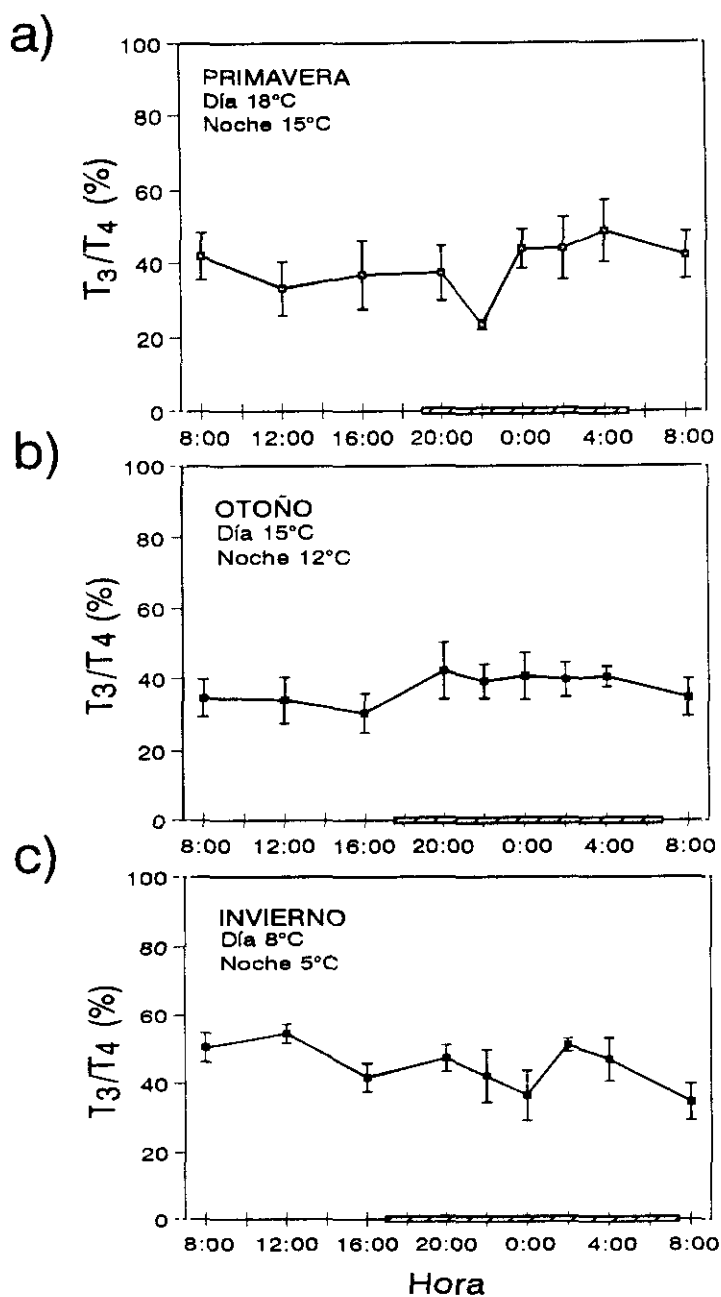


**Figura 22.** Cambios diarios de los niveles plasmáticos de  $T_3$  en *R. perezi*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=5-8$ ). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: **a)** \*  $p < 0,05$  respecto a las 8 y 12 h; #  $p < 0,05$  respecto a las 8, 22, 2 y 4 h; ##  $p < 0,01$  respecto a las 12 y 16 h; **b)** \*  $p < 0,05$  respecto a las 12, 20 y 22 h; **c)** \*  $p < 0,05$  respecto a las 16 h; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 20 h; #  $p < 0,05$  respecto a las 20 h.





**Figura 23.** Cambios diarios de los niveles plasmáticos de T<sub>4</sub> en *R. perezii*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=5-8). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: a) \*  $p < 0,05$  respecto a las 12, 16 y 22 h. Los niveles de T<sub>4</sub> en plasma no se pudieron determinar en verano.



**Figura 24.** Cambios diarios de la proporción  $T_3/T_4$  plasmática en *R. perezii*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=5-8$ ). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna).

En primavera el contenido de  $FT_3$  (Fig. 25) fue más elevado ( $p < 0,05$ ) al principio de la fase oscura que al final, tanto de la fase luminosa como de la fase oscura. Sin embargo, no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en ninguna otra estación.

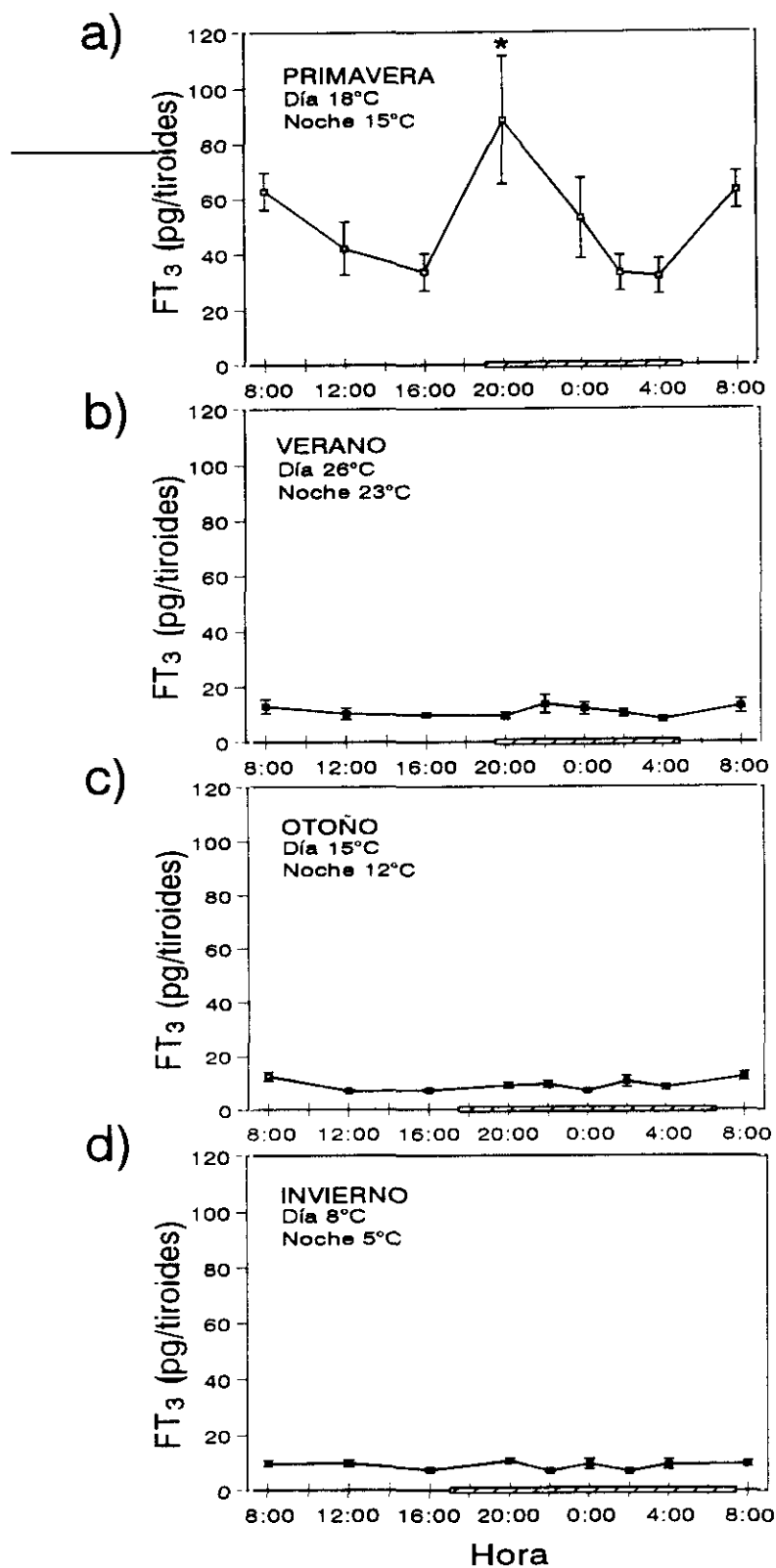
En cuanto al contenido de  $FT_4$  en primavera (Fig. 26a) el perfil diario fue similar al descrito para la  $FT_3$  en esta estación, aunque el incremento al inicio de la noche fue menos pronunciado en este caso y se detectaron contenidos medios más elevados al principio de la fase de luz. A pesar de todo, las diferencias fueron no significativas (ANOVA1,  $p > 0,05$ ). En otoño (Fig. 26c) se observó un máximo en el contenido de  $FT_4$  al principio de la fotofase (ANOVA1,  $p < 0,025$ ), mientras que no aparecieron cambios significativos ni en verano ni en invierno.

Con respecto al contenido tiroideo de HT unidas, los perfiles día/noche de  $BT_3$  (Fig. 27) y de  $BT_4$  (Fig. 28) fueron muy similares en primavera siguiendo el mismo patrón que los respectivos contenidos de hormonas libres ( $BT_3$ : ANOVA1,  $p < 0,0025$ ;  $BT_4$ : ANOVA1,  $p < 0,005$ ). De manera que el contenido de  $BT_3$  en primavera (Fig. 27a) es basal durante la fotofase, aumenta al principio de la fase oscura ( $p < 0,01$ ) y alcanza los valores más bajos al final de la noche. En cuanto al contenido de  $BT_4$  en esta estación (Fig. 28a), se observaron valores elevados al principio de las fases luminosa y oscura y los contenidos mínimos aparecen al final de la fase oscura del fotociclo diario. No se observaron cambios día/noche significativos de los contenidos de HT unidas ni en verano (Fig. 27b, 28b) ni en invierno (Fig. 27d, 28d). Por el contrario, también se encontraron cambios significativos en  $BT_3$  (ANOVA1,  $p < 0,025$ ) y  $BT_4$  (ANOVA1,  $p < 0,025$ ) en otoño (Fig. 27c, 28c), aunque en este caso los contenidos más elevados, comparado con los valores diurnos, aparecieron durante la última mitad del período oscuro.

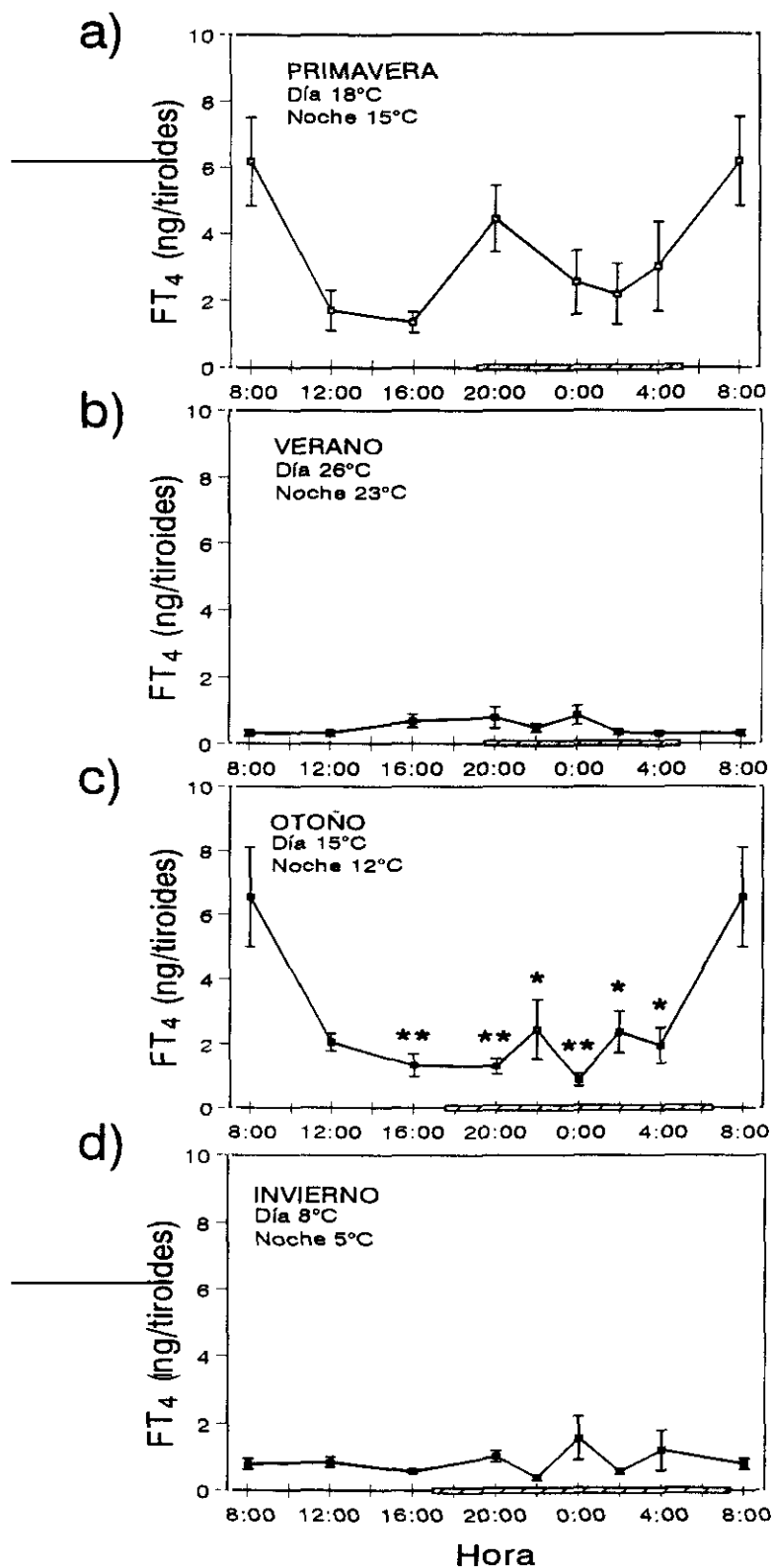
La relación  $FT_3/FT_4$  (Fig. 29) sólo presentó variaciones significativas en primavera (ANOVA1,  $p < 0,005$ ), con valores mínimos tanto al principio de la fotofase como hacia la última mitad de la fase oscura (2 h). Finalmente, la proporción  $BT_3/BT_4$  (Fig. 29) no presentó fluctuaciones día/noche significativas en ninguna de las estaciones.

### 3.2. Ciclos estacionales.

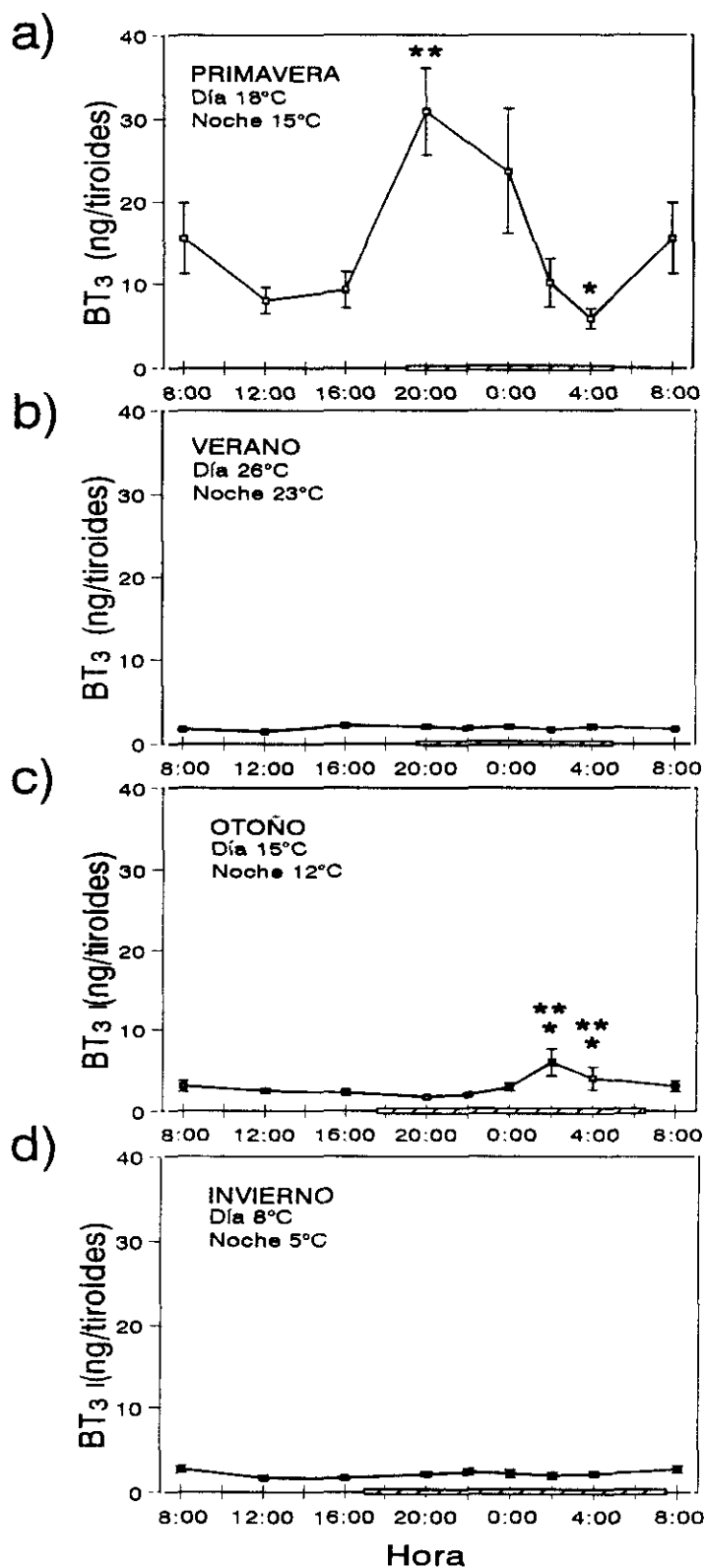
Los datos meteorológicos de la región de Pontevedra, de donde procedían los animales utilizados para el estudio del ciclo estacional de HT, se recogen en la Fig. 30. Se



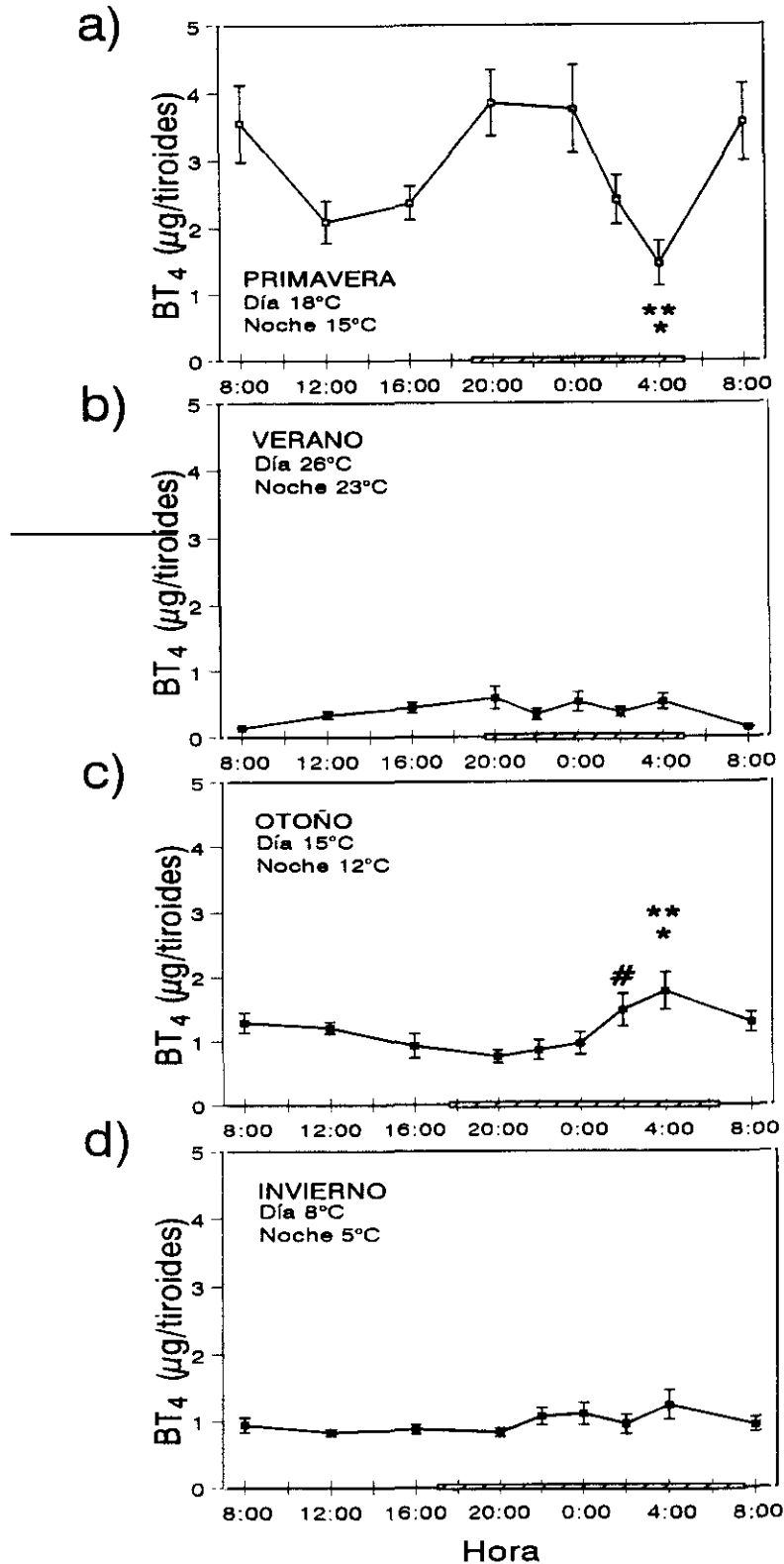
**Figura 25.** Cambios diarios del contenido tiroideo de FT<sub>3</sub> en *R. perezii*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=6-8). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: \*  $p < 0,05$  respecto a las 16, 2 y 4 h. En primavera sólo se evaluaron 4 puntos nocturnos.



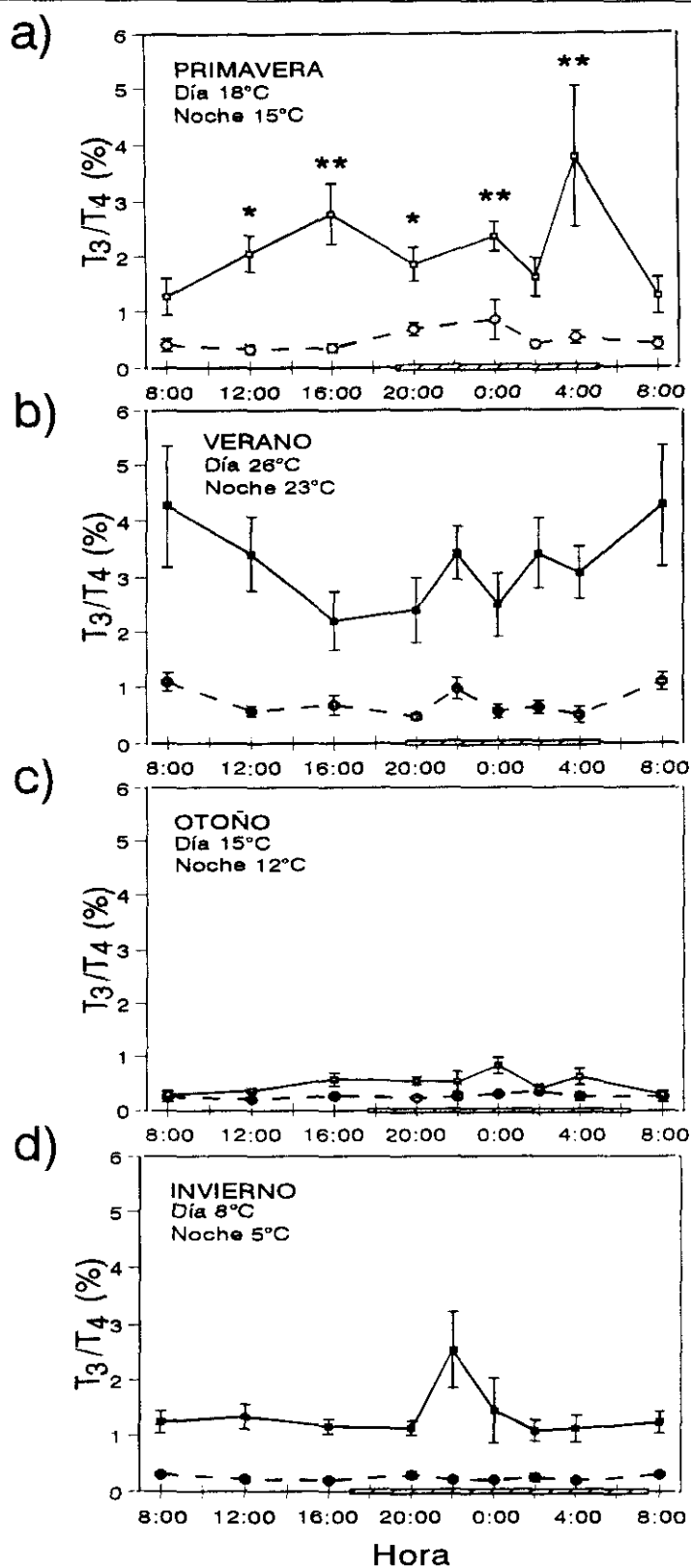
**Figura 26.** Cambios diarios del contenido tiroideo de FT<sub>4</sub> en *R. perezii*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=6-8). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 8 h. En primavera sólo se evaluaron 4 puntos nocturnos.



**Figura 27.** Cambios diarios del contenido tiroideo de BT<sub>3</sub> en *R. perezi*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=6-8). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: a) \*  $p < 0,05$  respecto a las 8 y 24 h; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 12, 16, 2 y 4 h; c) \*  $p < 0,05$  respecto a las 16 y 22 h; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 20 h. En primavera sólo se evaluaron 4 puntos nocturnos.



**Figura 28.** Cambios diarios del contenido tiroideo de BT<sub>4</sub> en *R. perezi*. Los datos se representan como la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=6-8). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: a) \*  $p < 0,05$  respecto a las 16 y 2 h; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 8, 20, y 24 h; c) #  $p < 0,05$  respecto a las 20 y 22 h; \*  $p < 0,05$  respecto a las 24 h; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 16, 20 y 22 h. En primavera sólo se evaluaron 4 puntos nocturnos.



**Figura 29.** Cambios diarios de las relaciones  $FT_3/FT_4$  ( $\square-\square$ ) y  $BT_3/BT_4$  ( $\bullet--\bullet$ ) tiroideas en *R. perezii*. Los datos se representan como  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=6-8$ ). La barra sombreada indica la fase oscura del ciclo diario. Las temperaturas representan la temperatura del agua máxima (diurna) y mínima (nocturna). Significación estadística: \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto a las 8 h. En primavera sólo se evaluaron 4 puntos nocturnos.



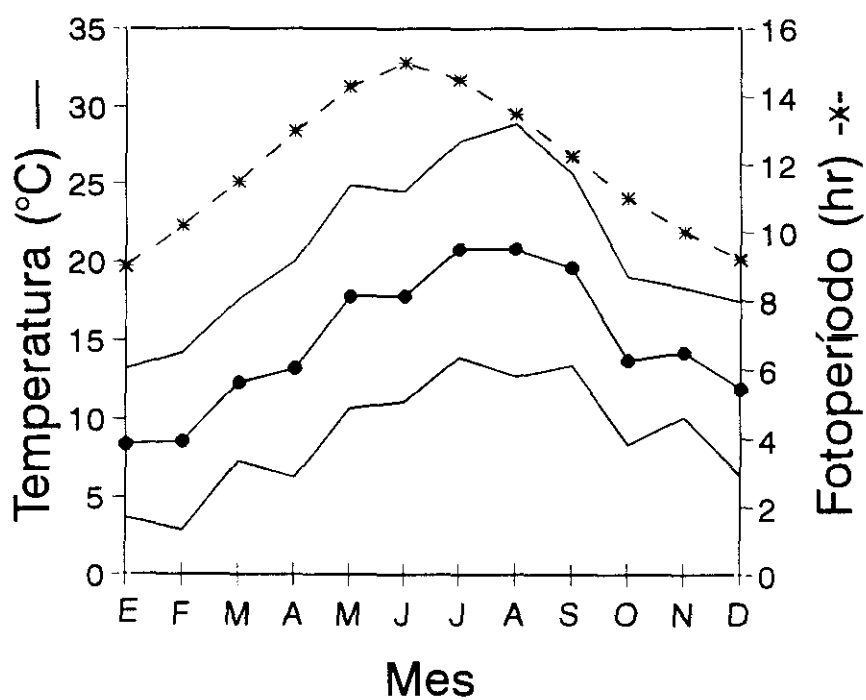
ha representado el fotoperíodo (número de horas de luz diarias) medio y la temperatura media mensual, así como la temperatura máxima y mínima.

En la Fig. 31 se han representado los resultados obtenidos en el estudio anual de los valores plasmáticos de HT en hembras y machos de *R. perezii*. Las diferencias significativas entre los valores medios mensuales se muestran en las Tablas III-V. Los niveles de  $T_3$  plasmáticos (Fig. 31a) presentan un ciclo estacional significativo (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ) tanto en machos como en hembras, no apreciándose diferencias entre sexos. Como podemos observar, aparecen niveles crecientes de Enero a Julio, momento en el que se alcanzan los valores máximos ( $\text{♀}$ :  $74,21 \pm 9,49$  pg/ml;  $\text{♂}$ :  $71,31 \pm 12,13$  pg/ml), con una pequeña inflexión no significativa en Abril. En Agosto-Octubre se produce un pronunciado descenso (Tabla III,  $p < 0,01$ ) de la  $T_3$  plasmática en los dos sexos, seguido de una cierta recuperación en Noviembre con valores similares a los observados en Enero.

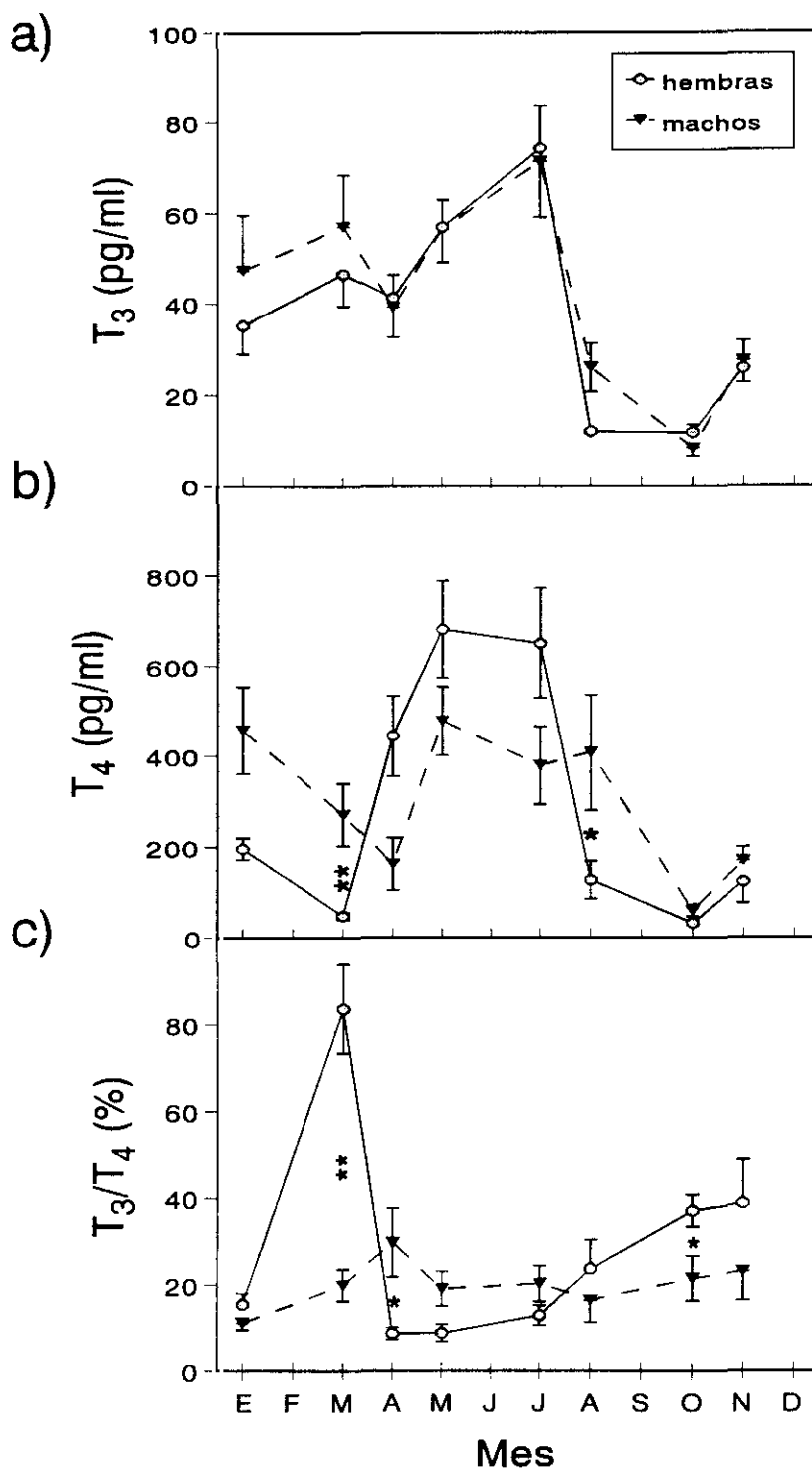
En cuanto a los niveles plasmáticos de  $T_4$  (Fig. 31b, Tabla IV), también muestran variaciones estacionales significativas (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ) y además se producen diferencias sexuales debidas a la interacción de los dos factores principales, mes y sexo (ANOVA2,  $p < 0,001$ ). Así, los machos presentan valores superiores a los encontrados en hembras en Marzo ( $p < 0,01$ ) y Agosto ( $p < 0,05$ ). Los niveles de  $T_4$  en machos son mínimos en Octubre ( $59,78 \pm 13,92$  pg/ml) y se mantienen más elevados el resto del año, con la excepción de Abril, momento en el que se observa un descenso significativo ( $p < 0,01$ ). En hembras se observan niveles basales desde el final del verano hasta el final del invierno con valores mínimos en Marzo y Octubre, mientras que los niveles más elevados ( $p < 0,01$ ) aparecen durante la primavera y el inicio del verano.

La relación  $T_3/T_4$  (Fig. 31c, Tabla V) sólo presenta variaciones anuales en hembras (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ). Aparece un máximo ( $p < 0,01$ ) en Marzo, se mantiene baja de Abril a Julio y muestra valores crecientes de Agosto a Noviembre sobrepasando los observados al inicio del invierno. Se aprecian diferencias sexuales en Marzo-Abril y Octubre.

Los datos relacionados con el contenido tiroideo de  $FT_3$  y  $FT_4$ , así como su relación, se presentan en la Fig. 32 y las Tablas VI-VIII. El perfil de los cambios anuales (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ) en  $FT_3$  (Fig. 32a) en hembras presenta dos picos, uno principal en Agosto (Tabla VIa,  $p < 0,01$ ) y otro más pequeño en Abril ( $p < 0,05$ ). En machos sólo aparece un pico en Julio (Tabla VIb,  $p < 0,01$ ). El contenido de  $FT_3$  en Julio es mayor en machos que en



**Figura 30.** Datos anuales del fotoperíodo medio, temperatura media (●—●) y oscilación de la temperatura (área sombreada) máxima-mínima de la zona de Porriño, Pontevedra (42° 09'N, 08° 37'W) durante los años 1991-1992.



**Figura 31.** Fluctuaciones estacionales de los niveles plasmáticos de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub> y c) de la proporción T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> plasmática en machos y hembras de *R. perezii*. Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=7-10/sexo/mes). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 entre machos y hembras en el mismo mes.

**Tabla III.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado a los niveles plasmáticos anuales de T<sub>3</sub> en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	ns	ns						
<b>My</b>	*	ns	ns					
<b>Jl</b>	**	*	*	ns				
<b>Ag</b>	**	**	**	**	**			
<b>Oc</b>	**	**	**	**	**	ns		
<b>Nv</b>	ns	*	ns	**	**	ns	ns	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	ns	ns						
<b>My</b>	ns	ns	ns					
<b>Jl</b>	ns	ns	*	ns				
<b>Ag</b>	ns	**	ns	**	**			
<b>Oc</b>	**	**	**	**	**	**		
<b>Nv</b>	ns	*	ns	**	**	ns	**	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla IV.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado a los niveles plasmáticos anuales de  $T_4$  en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	ns	**						
<b>My</b>	*	**	ns					
<b>Jl</b>	*	**	ns	ns				
<b>Ag</b>	ns	ns	**	**	**			
<b>Oc</b>	**	ns	**	**	**	ns		
<b>Nv</b>	ns	ns	*	**	**	ns	ns	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	**	ns						
<b>My</b>	ns	ns	**					
<b>Jl</b>	ns	ns	**	ns				
<b>Ag</b>	ns	ns	*	ns	ns			
<b>Oc</b>	**	*	ns	**	**	**		
<b>Nv</b>	ns	ns	ns	ns	ns	ns	*	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla V.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado a la relación  $T_3/T_4$  plasmática anual en hembras de *R. perezii*.

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	ns	**						
<b>My</b>	ns	**	ns					
<b>Jl</b>	ns	**	ns	ns				
<b>Ag</b>	ns	**	ns	ns	ns			
<b>Oc</b>	*	**	**	**	*	ns		
<b>Nv</b>	*	**	**	**	*	ns	ns	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

hembras ( $p < 0,01$ ), mientras que en Agosto se produce la situación contraria.

El contenido de  $FT_4$  (Fig. 32b, Tabla VII) presenta un patrón estacional similar al de  $FT_3$ , y se producen cambios anuales significativos tanto en machos como en hembras (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ). Se aprecian interacciones mes-sexo (ANOVA2,  $p < 0,001$ ).

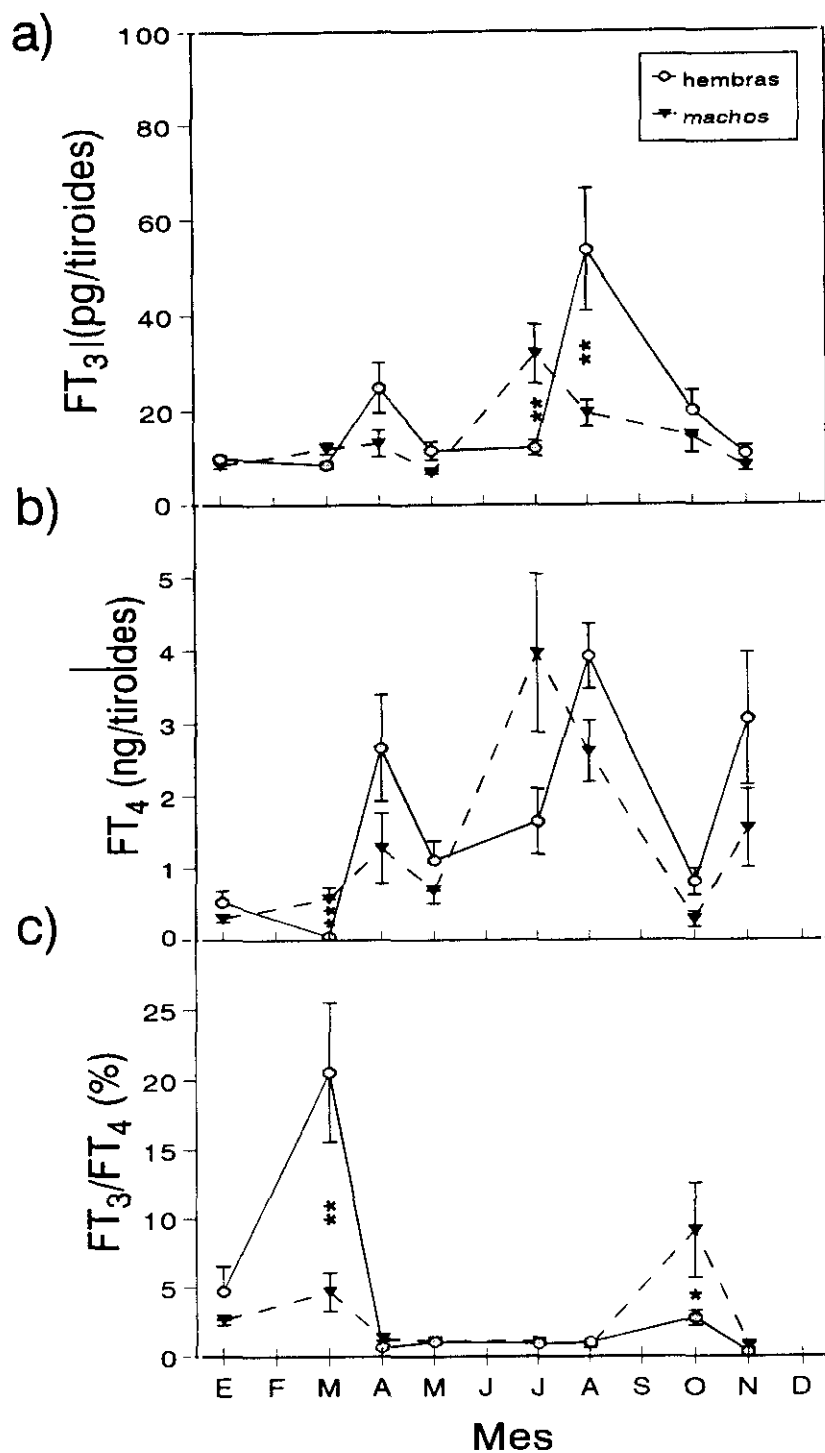
En la Fig. 32c podemos observar las variaciones estacionales de la relación  $FT_3/FT_4$  que son significativas (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ) en los dos sexos. En hembras aparece un máximo (20,56 %) en Marzo (Tabla VIIIa,  $p < 0,01$ ), mientras que en machos (Tabla VIIIb) también se alcanzan valores elevados, aunque inferiores a los de hembras, en Octubre (9,13 %).

Al igual que ocurre con el resto de los parámetros de actividad tiroidea, el contenido de  $BT_3$ ,  $BT_4$  y su correspondiente relación  $BT_3/BT_4$  (Fig. 33, Tablas IX-XI) presentan un ciclo estacional significativo (ANOVA2,  $p < 0,0001$ ) en los dos sexos. En machos el contenido de  $T_3$  unida (Fig. 33a) se mantiene bajo desde el final del verano hasta Enero, presentando valores más elevados durante el resto del año (Marzo-Julio). En cuanto a las hembras, también se encuentran contenidos basales en Noviembre-Enero, y se observan dos picos, uno en Abril (Tabla IXa,  $p < 0,05$ ) y otro de mayor magnitud en Julio ( $p < 0,01$ ). Los valores de hembras son en general más elevados que en machos, con diferencias estadísticamente significativas a lo largo de todo el ciclo anual exceptuando Enero, Marzo y Mayo.

El contenido de  $BT_4$  (Fig. 33b Tabla X) presenta cambios anuales muy similares en los dos sexos, con un mínimo en Marzo ( $p < 0,01$ ) y un máximo en el verano ( $p < 0,01$ ). En Abril podemos observar también un mayor contenido de  $BT_4$ , sobre todo en hembras. De nuevo se pueden apreciar diferencias entre sexos (ANOVA2,  $p < 0,001$ ), si bien en este caso no hay interacciones entre los dos factores principales.

Por último, en la Fig. 33c se ha representado el patrón estacional de la relación  $BT_3/BT_4$ , que es parecido en machos y hembras observándose un máximo (Tabla XI) en Marzo ( $p < 0,01$ ) y valores mínimos en Agosto y Noviembre. En este caso el pico es mayor en machos que en hembras ( $p < 0,01$ ).

El análisis de correlación de los distintos parámetros de actividad tiroidea (Tabla XII) indican la existencia de una correlación negativa entre los niveles plasmáticos de  $T_3$  y el contenido de  $FT_3$  que fue significativa ( $p < 0,005$ ) sólo en hembras ( $r = -0,326$ ). Por el



**Figura 32.** Fluctuaciones estacionales del contenido tiroideo de a)  $FT_3$  y b)  $FT_4$  y c) de la relación  $FT_3/FT_4$  en machos y hembras de *R. perezi*. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=7-10/sexo/mes). \* p < 0,05; \*\* p < 0,01 entre machos y hembras en el mismo mes.



**Tabla VI.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado al contenido tiroideo anual de FT<sub>3</sub> en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.**a)**

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	*	**						
<b>My</b>	ns	ns	*					
<b>Jl</b>	ns	ns	ns	ns				
<b>Ag</b>	**	**	**	**	**			
<b>Oc</b>	ns	*	ns	ns	ns	**		
<b>Nv</b>	ns	ns	*	ns	ns	**	ns	

**b)**

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	ns	ns						
<b>My</b>	ns	ns	ns					
<b>Jl</b>	**	**	**	**				
<b>Ag</b>	**	ns	ns	**	ns			
<b>Oc</b>	ns	ns	ns	ns	**	ns		
<b>Nv</b>	ns	ns	ns	ns	**	**	ns	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla VII.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado al contenido tiroideo anual de FT<sub>4</sub> en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	**	**						
<b>My</b>	ns	**	ns					
<b>Jl</b>	*	**	ns	ns				
<b>Ag</b>	**	**	ns	**	ns			
<b>Oc</b>	ns	**	**	ns	*	**		
<b>Nv</b>	**	**	ns	ns	ns	ns	**	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	*	ns						
<b>My</b>	ns	ns	ns					
<b>Jl</b>	**	**	*	**				
<b>Ag</b>	**	**	ns	**	ns			
<b>Oc</b>	ns	ns	**	*	**	**		
<b>Nv</b>	ns	ns	ns	ns	*	ns	**	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla VIII.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado a la relación  $FT_3/FT_4$  tiroidea anual en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

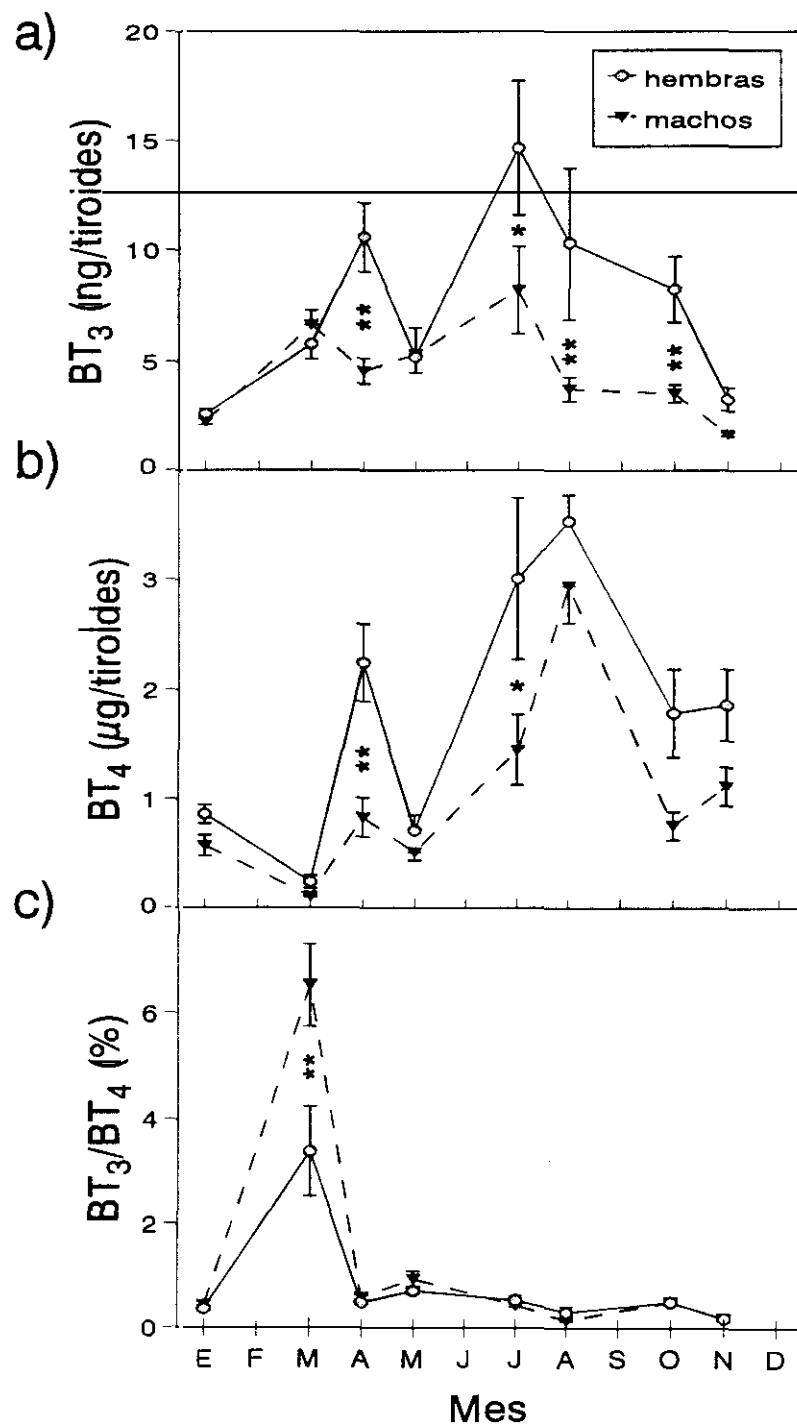
a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	**	**						
<b>My</b>	*	**	*					
<b>Jl</b>	*	**	*	ns				
<b>Ag</b>	*	**	*	ns	ns			
<b>Oc</b>	ns	**	**	*	*	*		
<b>Nv</b>	**	**	ns	**	*	*	**	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	ns	*						
<b>My</b>	*	**	ns					
<b>Jl</b>	*	**	ns	ns				
<b>Ag</b>	**	**	ns	ns	ns			
<b>Oc</b>	*	ns	**	**	**	**		
<b>Nv</b>	**	**	ns	ns	ns	ns	**	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.



**Figura 33.** Fluctuaciones estacionales del contenido tiroideo de a)  $BT_3$  y b)  $BT_4$  y c) de la relación  $BT_3/BT_4$  en machos y hembras de *R. perezii*. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. ( $n=7-10/\text{sexo/mes}$ ). \*  $p < 0.05$ ; \*\*  $p < 0.01$  entre machos y hembras en el mismo mes.

**Tabla IX.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado al contenido tiroideo anual de BT<sub>3</sub> en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	*							
<b>Ab</b>	**	*						
<b>My</b>	*	ns	*					
<b>Jl</b>	**	**	*	**				
<b>Ag</b>	**	ns	ns	ns	*			
<b>Oc</b>	**	ns	ns	ns	*	ns		
<b>Nv</b>	ns	*	**	ns	**	**	**	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	*	ns						
<b>My</b>	*	ns	ns					
<b>Jl</b>	**	ns	ns	ns				
<b>Ag</b>	ns	*	ns	ns	*			
<b>Oc</b>	ns	*	ns	ns	*	ns		
<b>Nv</b>	ns	**	**	**	**	*	*	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla X.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado al contenido tiroideo anual de BT<sub>4</sub> en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	*	**						
<b>My</b>	ns	**	*					
<b>Jl</b>	**	**	ns	**				
<b>Ag</b>	**	**	ns	**	ns			
<b>Oc</b>	ns	**	ns	*	ns	**		
<b>Nv</b>	ns	**	ns	**	ns	*	ns	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	ns	**						
<b>My</b>	ns	**	ns					
<b>Jl</b>	ns	**	ns	*				
<b>Ag</b>	**	**	**	**	**			
<b>Oc</b>	ns	**	ns	ns	ns	**		
<b>Nv</b>	ns	**	ns	*	ns	**	ns	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla XI.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado a la relación  $BT_3/BT_4$  tiroidea anual en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	ns	**						
<b>My</b>	*	**	ns					
<b>Jl</b>	ns	**	ns	ns				
<b>Ag</b>	*	**	**	**	**			
<b>Oc</b>	ns	**	ns	ns	ns	**		
<b>Nv</b>	*	**	**	**	**	ns	**	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	ns	**						
<b>My</b>	**	**	ns					
<b>Jl</b>	ns	**	ns	**				
<b>Ag</b>	**	**	**	**	**			
<b>Oc</b>	ns	**	ns	*	ns	**		
<b>Nv</b>	**	**	**	**	**	ns	**	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.

**Tabla XII.** Análisis de correlación de los distintos parámetros de la actividad tiroidea durante el ciclo estacional en hembras y machos de *Rana perezii*.

	$T_3-FT_3$	$FT_3-BT_3$	$T_4-FT_4$	$FT_4-BT_4$	$T_3-T_4$	$FT_3-FT_4$	$BT_3-BT_4$
<b>Hembras</b>							
r=	-0.326	0.221	0.020	0.483	0.622	0.519	0.607
p	**	*	N.S.	***	***	***	***
<b>Machos</b>							
r=	-0.005	0.439	0.220	0.647	0.559	0.655	0.188
p	N.S.	***	*	***	***	***	N.S.

Significación estadística: \*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.005$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; N.S., no significativo.



contrario, se observa una correlación positiva ( $p < 0,05$ ) entre los niveles plasmáticos de  $T_4$  y el contenido de  $FT_4$  en machos ( $r = 0,220$ ). También se detecta una correlación positiva significativa entre  $FT_3$ - $BT_3$  y  $FT_4$ - $BT_4$ , así como entre la  $T_3$  y  $T_4$  plasmática y tiroidea (F y B) en ambos sexos, con la excepción del par  $BT_3$ - $BT_4$  en machos.

A lo largo del estudio anual también se recogieron los datos referentes al peso de varios órganos (gónadas e hígado), expresándose su evolución en forma de índice organosomático en la Fig. 34. El IGS (Fig. 34a) en hembras presenta un máximo en primavera (Tabla XIIIa), seguido de un abrupto descenso en verano. En otoño se observa una recuperación del peso ovárico. En machos se aprecia un IGS mínimo en Enero y valores máximos en otoño (Fig. 34a, Tabla XIIIb). En relación al índice hepatosomático (Fig. 34b) aparecen cambios estacionales significativos (ANOVA2,  $p < 0,001$ ) en los dos sexos. El IHS muestra un descenso significativo en Abril (Tabla XIV).

#### **4. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA EN *R. perezii*. INTERACCIONES CON OTROS EJES NEUROENDOCRINOS.**

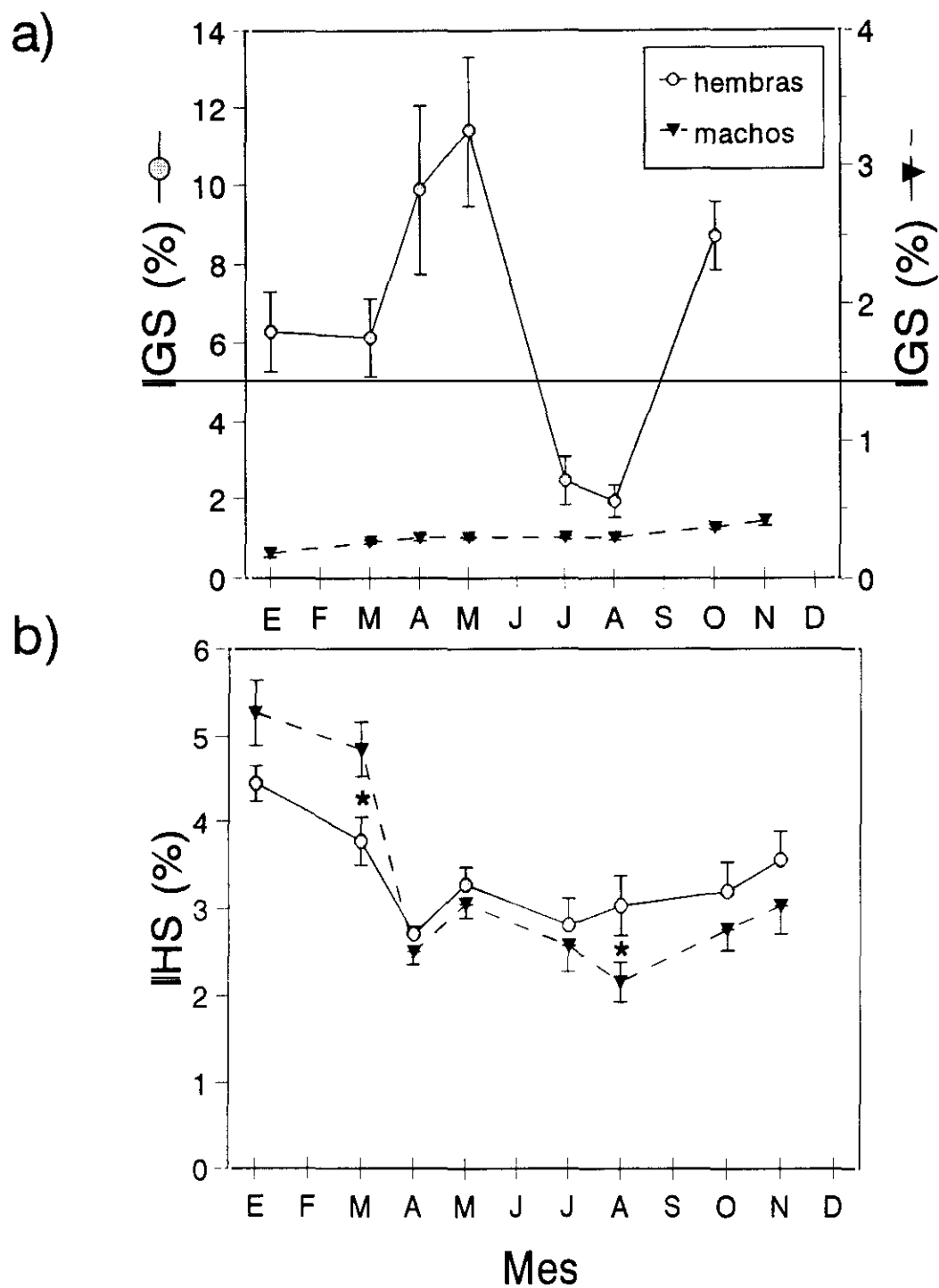
Debido al distinto diseño experimental utilizado para larvas y adultos (véase Materiales y Métodos) expondremos los resultados obtenidos por separado.

##### **4.1. Larvas.**

###### **4.1.1. CONTROL HIPOTALÁMICO DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA. PAPEL DEL CRF.**

###### **a) Efecto del tratamiento crónico con hCRF.**

Las Figs. 35 y 36 muestran los efectos de la administración crónica de hCRF sobre el crecimiento (longitud total y peso corporal húmedo) y la metamorfosis (longitud de las extremidades posteriores y anchura caudal) de larvas prometamórficas de *R. perezii*. Podemos observar que las dos dosis de hCRF utilizadas (0,5 y 1  $\mu$ g) reducen considerablemente ( $p < 0,01$ ) la longitud total (Fig. 35a) al final del tratamiento. También se observa una disminución significativa del peso corporal a lo largo del período experimental (Fig. 35b). Con respecto al desarrollo metamórfico, las larvas tratadas con hCRF muestran una mayor



**Figura 34.** Variaciones anuales de los índices a) gonadosomático (IGS) y b) hepatosomático (IHS) en machos y hembras de *R. perezii*. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=7-10/sexo/mes). \*  $p < 0,05$  entre machos y hembras en el mismo mes.

**Tabla XIII.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado al índice gonadosomático anual en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	ns	ns						
<b>My</b>	*	**	**					
<b>Jl</b>	*	**	**	**				
<b>Ag</b>	*	**	**	**	ns			
<b>Oc</b>	ns	ns	ns	ns	**	**		
<b>Nv</b>	--	--	--	--	--	--	--	

b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	**							
<b>Ab</b>	**	ns						
<b>My</b>	**	ns	ns					
<b>Jl</b>	**	ns	ns	ns				
<b>Ag</b>	**	ns	ns	ns	ns			
<b>Oc</b>	**	**	*	*	ns	*		
<b>Nv</b>	**	**	**	**	**	**	ns	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo; --, no medido.

**Tabla XIV.** Resultados del test de Duncan de comparaciones múltiples aplicado al índice hepatosomático anual en a) hembras y b) machos de *R. perezii*.

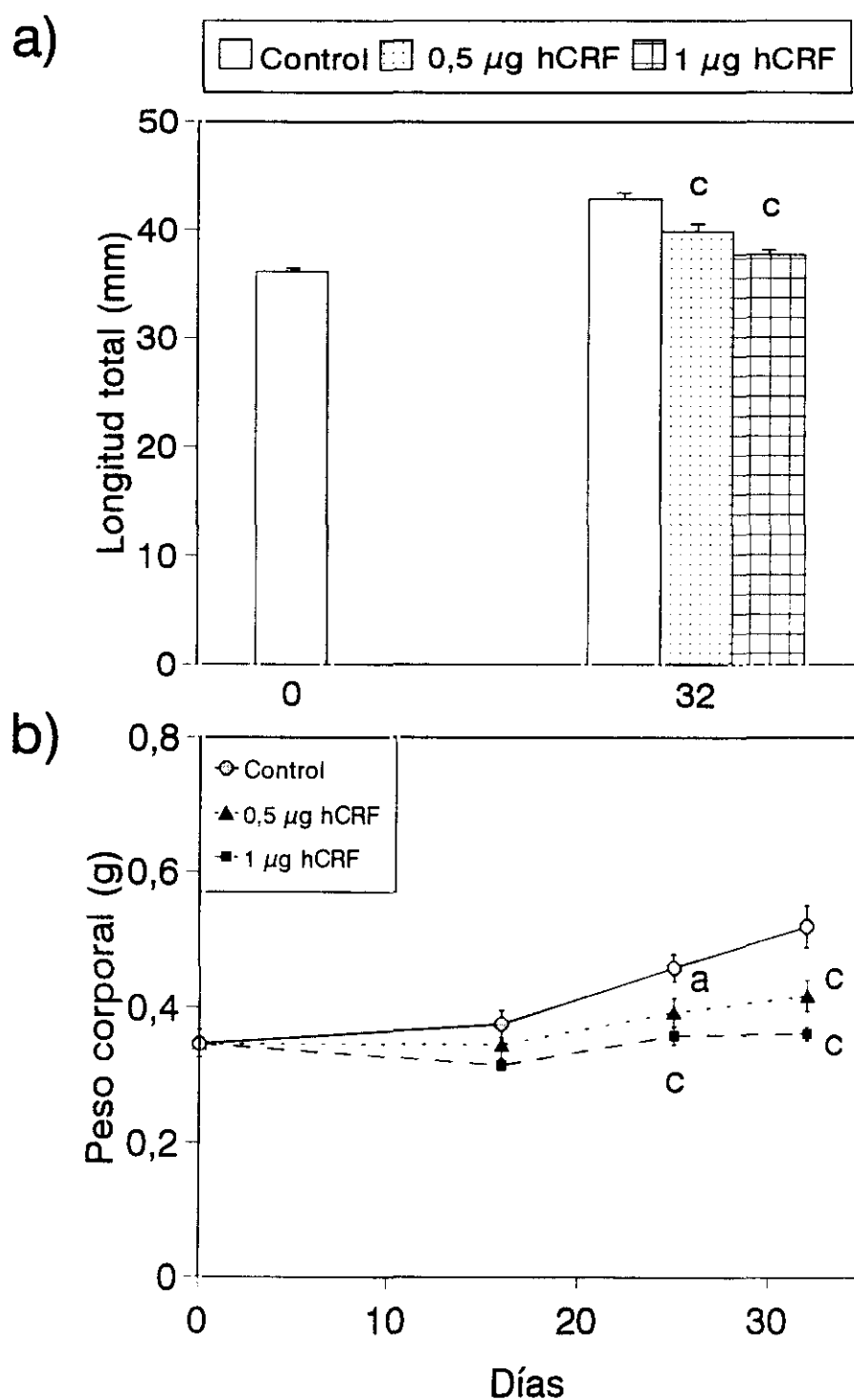
a)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	**	*						
<b>My</b>	**	ns	ns					
<b>Jl</b>	**	*	ns	ns				
<b>Ag</b>	**	ns	ns	ns	ns			
<b>Oc</b>	**	ns	ns	ns	ns	ns		
<b>Nv</b>	**	ns	ns	ns	ns	ns	ns	

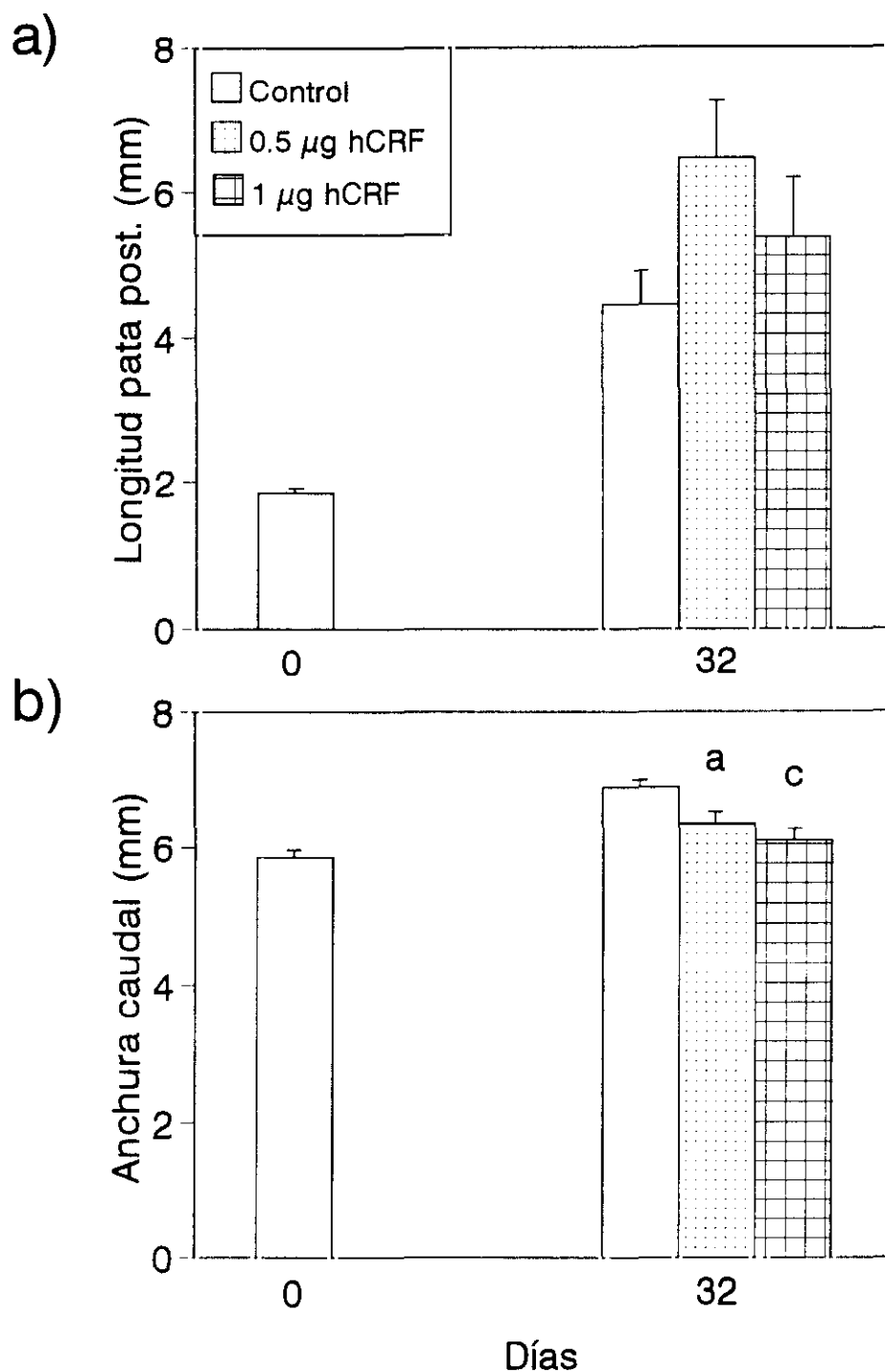
b)

	En	Mz	Ab	My	Jl	Ag	Oc	Nv
<b>En</b>								
<b>Mz</b>	ns							
<b>Ab</b>	**	**						
<b>My</b>	**	**	ns					
<b>Jl</b>	**	**	ns	ns				
<b>Ag</b>	**	**	ns	*	ns			
<b>Oc</b>	**	**	ns	ns	ns	ns		
<b>Nv</b>	**	**	ns	ns	ns	*	ns	

Significación estadística: \*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; ns, no significativo.



**Figura 35.** Efecto del tratamiento crónico con CRF humano (hCRF) sobre: a) la longitud total y b) el peso corporal de larvas prometamórficas de *R. perezii*. Las larvas se inyectaron en días alternos durante un mes con hCRF (0,5 y 1 µg). Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=8). Significación estadística respecto al grupo control: a,  $p < 0,05$ ; c,  $p < 0,01$ .



**Figura 36.** Efecto del tratamiento crónico con CRF humano (hCRF) sobre: a) la longitud de la extremidad posterior y b) la anchura caudal de larvas prometamórficas de *R. perezii*. Las larvas se inyectaron en días alternos durante un mes con hCRF (0,5 y 1 µg). Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=8). Significación estadística respecto al grupo control: a,  $p < 0,05$ ; c,  $p < 0,01$ .

longitud media de las extremidades posteriores que el control (Fig. 36a), aunque no es estadísticamente significativo. Sin embargo, se produce una reducción de la anchura caudal (Fig. 36b) sugiriendo una aceleración de la metamorfosis.

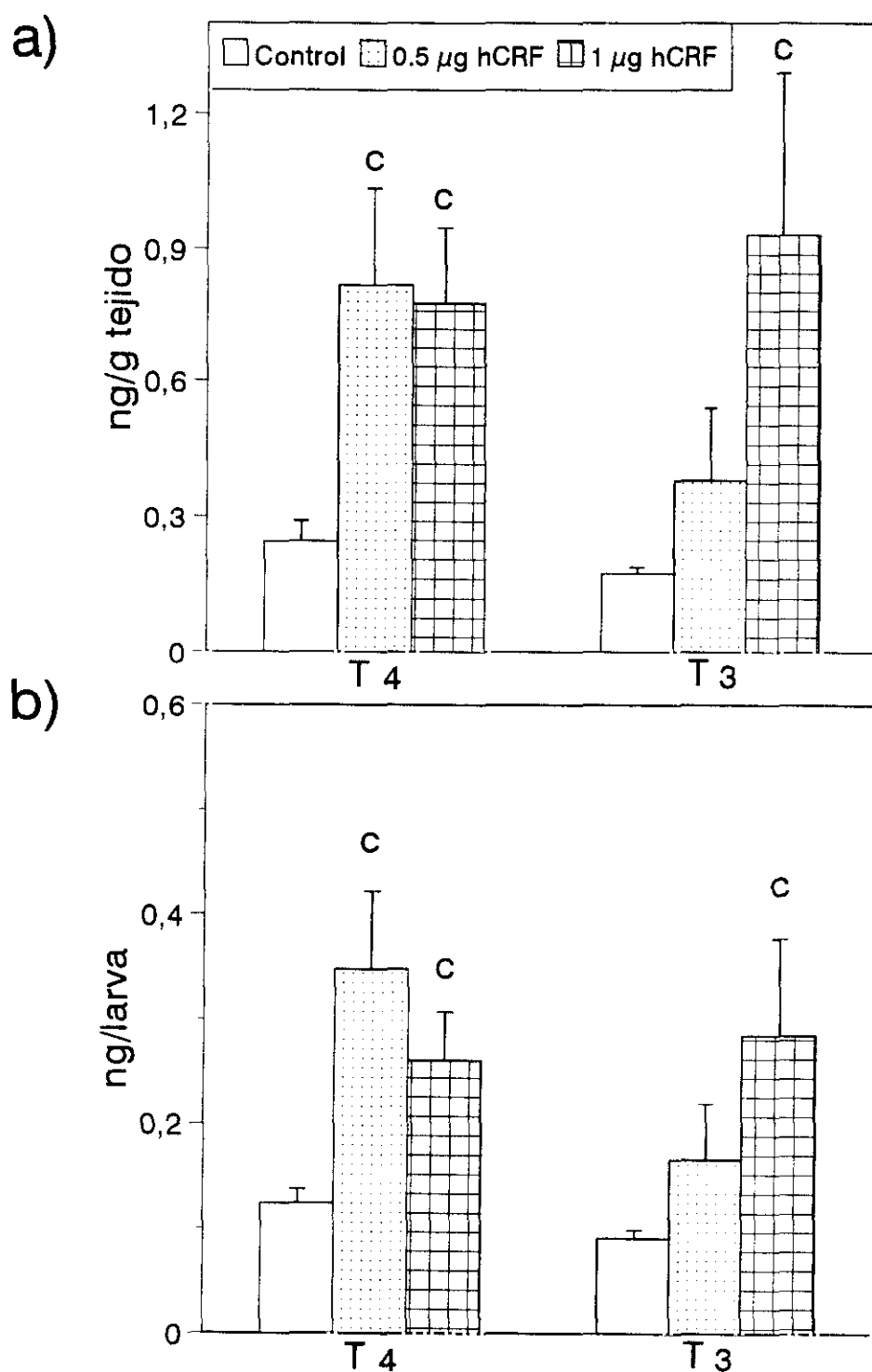
Los efectos del tratamiento crónico con hCRF sobre la concentración total de  $T_3$  y  $T_4$  (ng/g tejido) se presentan en la Fig. 37a. Las dos dosis de hCRF incrementan la concentración de  $T_4$  unas tres veces por encima de los controles. La dosis mayor (1  $\mu$ g) también induce un aumento significativo ( $p < 0,025$ ) de la concentración de  $T_3$ , mientras que con la dosis de 0,5  $\mu$ g se observa un valor medio superior, pero no significativo, con respecto a los controles. Para asegurarnos de que el incremento de las concentraciones de HT no es un artefacto debido al descenso de peso corporal, aplicamos el análisis estadístico al contenido total de HT (ng/larva). Los resultados (Fig. 37b) confirman los cambios observados para las concentraciones de HT.

#### **b) Efecto del tratamiento crónico y agudo con oCRF.**

La **administración crónica** de oCRF (1  $\mu$ g) produce efectos sobre el crecimiento y la metamorfosis de *R. perezi* similares a los observados con hCRF. Como se observa en la Fig. 38, tras el tratamiento con oCRF se produce un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) tanto de la longitud total como del peso corporal. En cuanto a los parámetros indicadores del desarrollo metamórfico, el oCRF induce un incremento de la longitud de las extremidades posteriores (Fig. 39a) y una reducción de la anchura caudal (Fig. 39b).

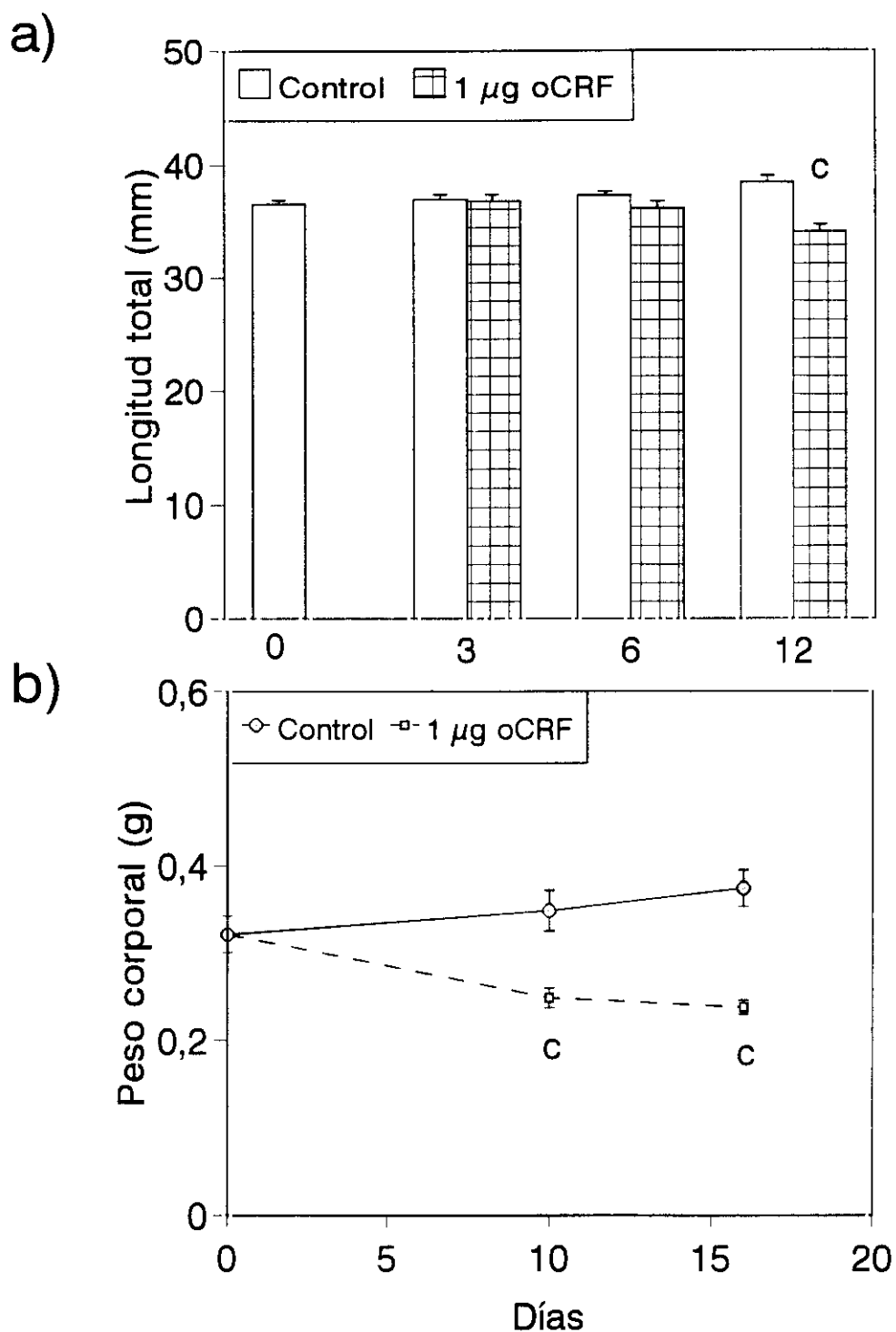
En la Tabla XV se expresan los resultados obtenidos en el estudio histológico de la glándula tiroidea de larvas de *R. perezi* tras el tratamiento crónico con oCRF. Como podemos observar, el oCRF induce un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) del número de folículos por sección. La altura del epitelio folicular no cambia y, aunque el diámetro folicular medio es inferior al control, no es estadísticamente significativo.

El **tratamiento agudo** con oCRF (2  $\mu$ g) induce un aumento significativo de la concentración total de  $T_4$  a las 4 ( $p < 0,05$ ) y a las 8 horas ( $p < 0,025$ ), mientras que no se observaron cambios significativos en la concentración de  $T_3$  (Fig. 40).

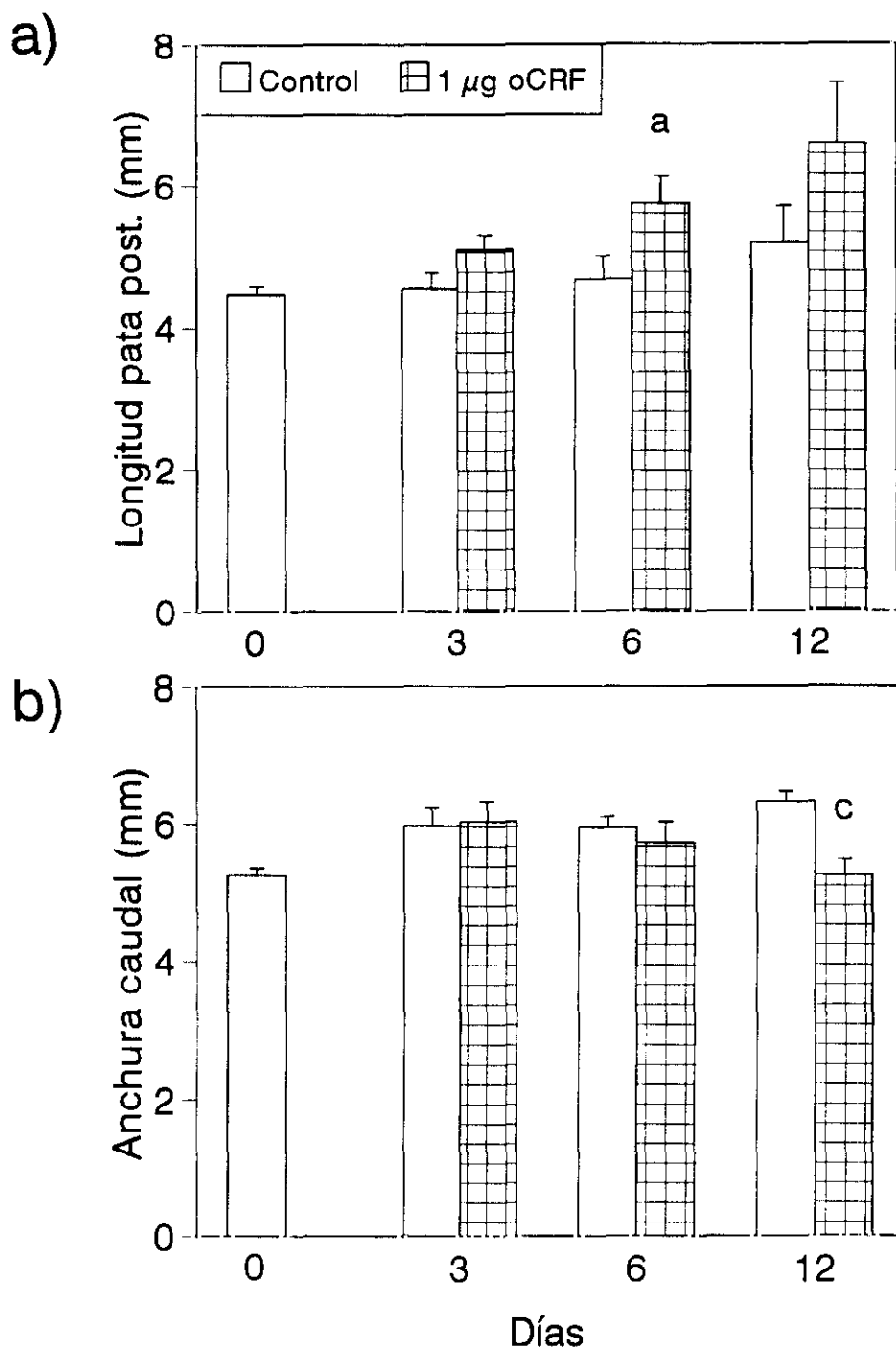


**Figura 37.** Efecto del tratamiento crónico con CRF humano (hCRF) sobre: a) las concentraciones y b) el contenido total de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en larvas prometamórficas de *R. perezii*. Las larvas se inyectaron en días alternos durante un mes con hCRF (0,5 y 1 µg). Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=8). Significación estadística respecto al grupo control: c,  $p < 0,01$ .





**Figura 38.** Efecto del tratamiento crónico con CRF ovino (oCRF) sobre: a) la longitud total y b) el peso corporal de larvas prometamórficas de *R. perezii*. Las larvas se inyectaron diariamente durante dos semanas con oCRF (1 µg). Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=8). Significación estadística respecto al grupo control: c,  $p < 0,01$ .

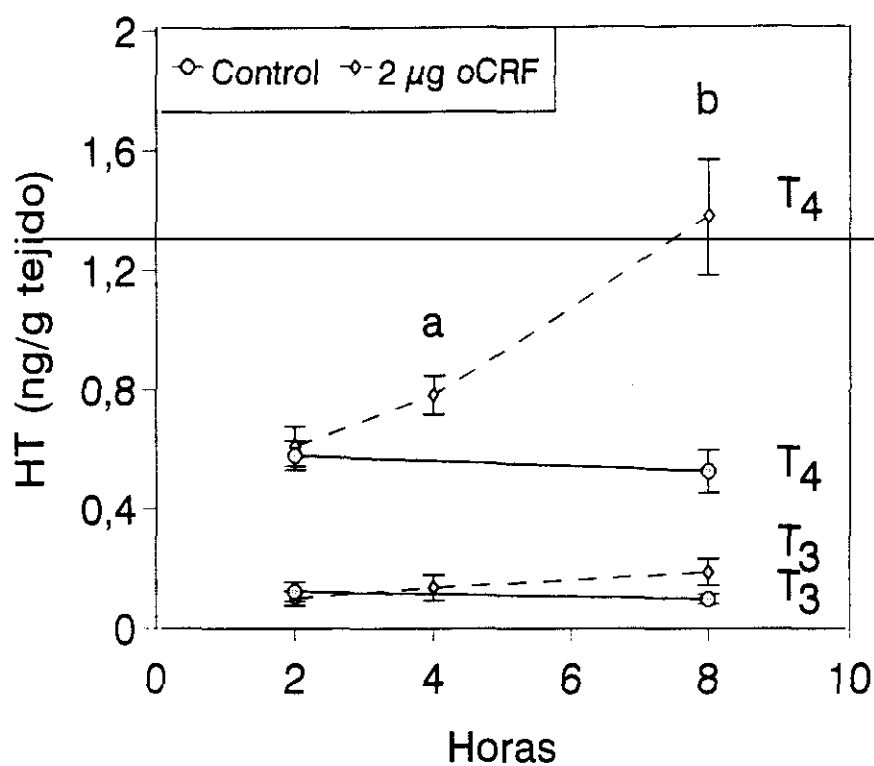


**Figura 39.** Efecto del tratamiento crónico con CRF ovino (oCRF) sobre: a) la longitud de la extremidad posterior y b) el la anchura caudal de larvas prometamórficas de *R. perezi*. Las larvas se inyectaron diariamente durante dos semanas con oCRF (1 µg). Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=8). Significación estadística respecto al grupo control: a,  $p < 0,05$ ; c,  $p < 0,01$ .

**Tabla XV.** Efecto del tratamiento crónico con oCRF sobre el *status* tiroideo de larvas prometamórficas de *R. perezii*.

	Control	oCRF
Nº folículos/sección	11,10±0,39	13,63±0,72 *
Altura epitelio folicular (µm)	6,52±0,97	6,12±0,06
Diámetro folicular (µm)	111,35±46,78	68,48±13,31

Las larvas fueron inyectadas diariamente durante dos semanas con oCRF (1 µg) disuelto en una solución de Holtfreter al 10%. Los datos se expresan como la media ± e.e.m. (n=30/larva). Significación estadística: \*, p<0,05.



**Figura 40.** Efecto del tratamiento agudo con CRF ovino (oCRF) sobre la concentración de T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> en larvas prometamórficas (XI-XVII TK) de *R. perezii*. Las larvas recibieron una única inyección con oCRF (2 µg) y fueron sacrificadas a las 2, 4 y 8 h de la inyección. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=10). Significación estadística respecto al grupo control: a,  $p < 0,05$ ; b,  $p < 0,025$ .

#### **4.1.2. RELACIÓN PINEAL-TIROIDES-GÓNADAS.**

##### **a) Efecto de la melatonina sobre la actividad tiroidea.**

El tratamiento agudo de larvas prometamórficas de *R. perezi* con MEL (0,5 mM) durante la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D) no afecta a la concentración de  $T_3$  (Fig. 41a), pero induce un aumento ( $p < 0,05$ ) de la concentración de  $T_4$  (Fig. 41b) acompañado de un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) de la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 41c). El tratamiento con  $T_4$  (0,1  $\mu$ M) durante la fase oscura del fotociclo induce un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $T_3$  que no se ve afectado por el tratamiento conjunto con MEL (Fig. 41a).

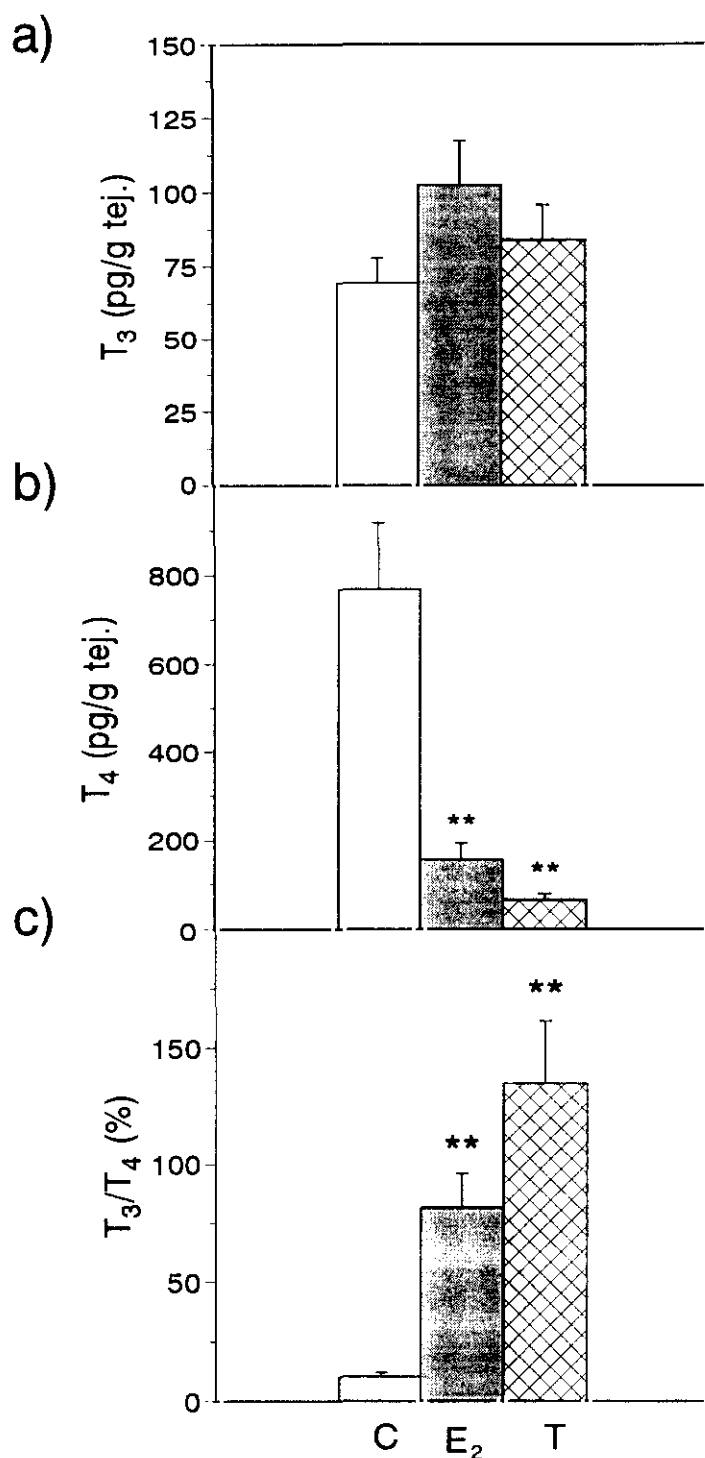
La eliminación de una noche, es decir la aplicación de 24L de forma aguda durante un día (24 horas) induce un descenso de  $T_3$  (Fig. 41a) y  $T_4$  (Fig. 41b), sin alterar su relación (Fig. 41c), con respecto a los controles. El tratamiento con MEL revierte el efecto de 24L sobre la concentración de  $T_3$  e incluso incrementa la concentración de  $T_4$  en relación a todos los demás grupos (Fig. 41b). La concentración de  $T_3$  en el grupo  $T_4+24L$  es significativamente ( $p < 0,05$ ) menor que en el tratado con  $T_4$  (Fig. 41a). Sin embargo, el tratamiento con MEL revierte este efecto. El tratamiento con MEL+24L produce una reducción de la proporción  $T_3/T_4$  comparado con el resto de los grupos (Fig. 41c).

##### **b) Efecto de los esteroides gonadales sobre la actividad tiroidea.**

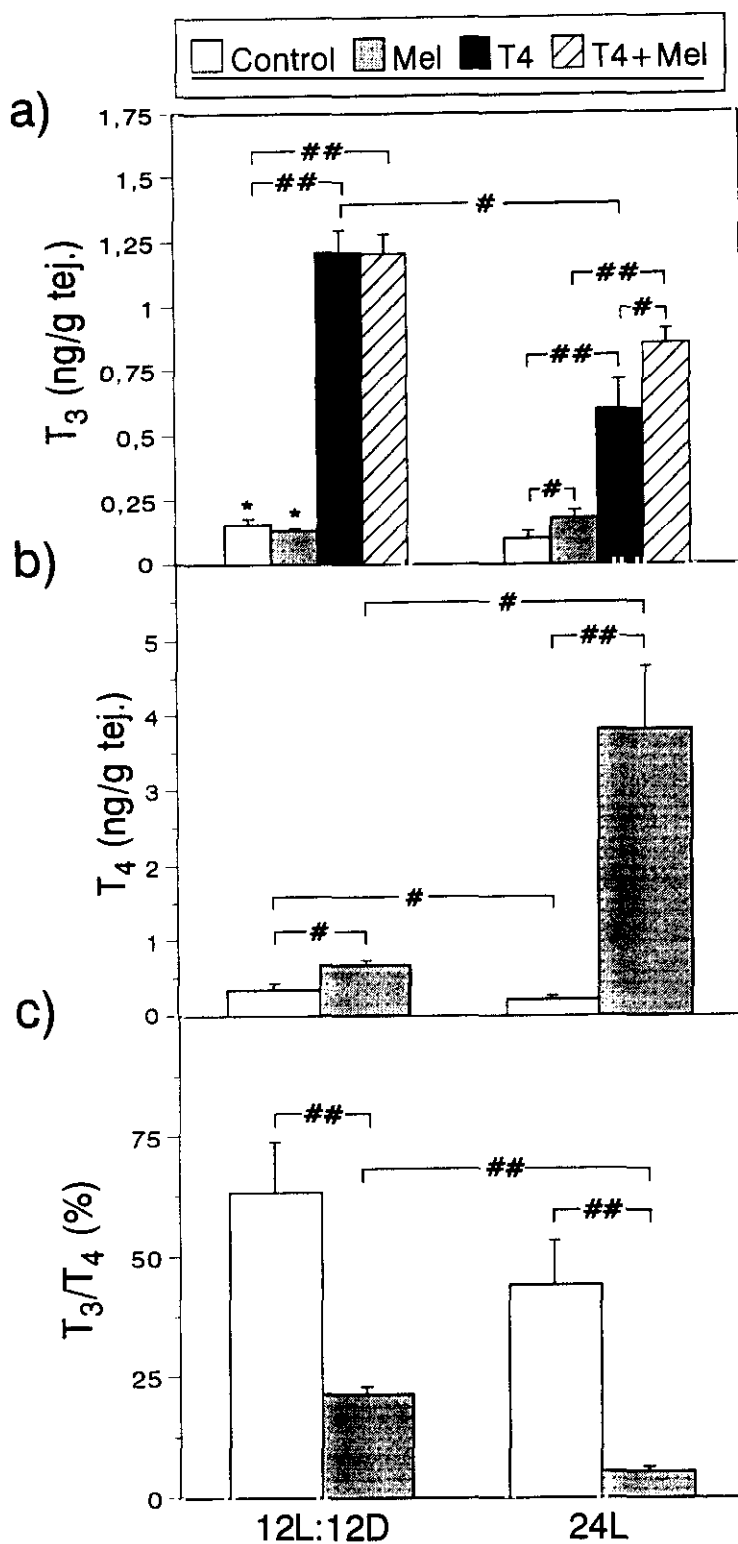
En la Fig. 42 se puede observar el efecto del tratamiento agudo con esteroides gonadales ( $E_2$  y T, 5 $\mu$ M) sobre el contenido de HT de larvas prometamórficas de *R. perezi*. La concentración de  $T_3$  (Fig. 42a) no es modificada por ninguno de los dos tratamientos, mientras que tanto el  $E_2$  como la testosterona inducen un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $T_4$  (Fig. 42b). Además, se produce un incremento ( $p < 0,01$ ) paralelo de la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 42c).

##### **c) Efecto de las hormonas tiroideas y la melatonina sobre los esteroides gonadales.**

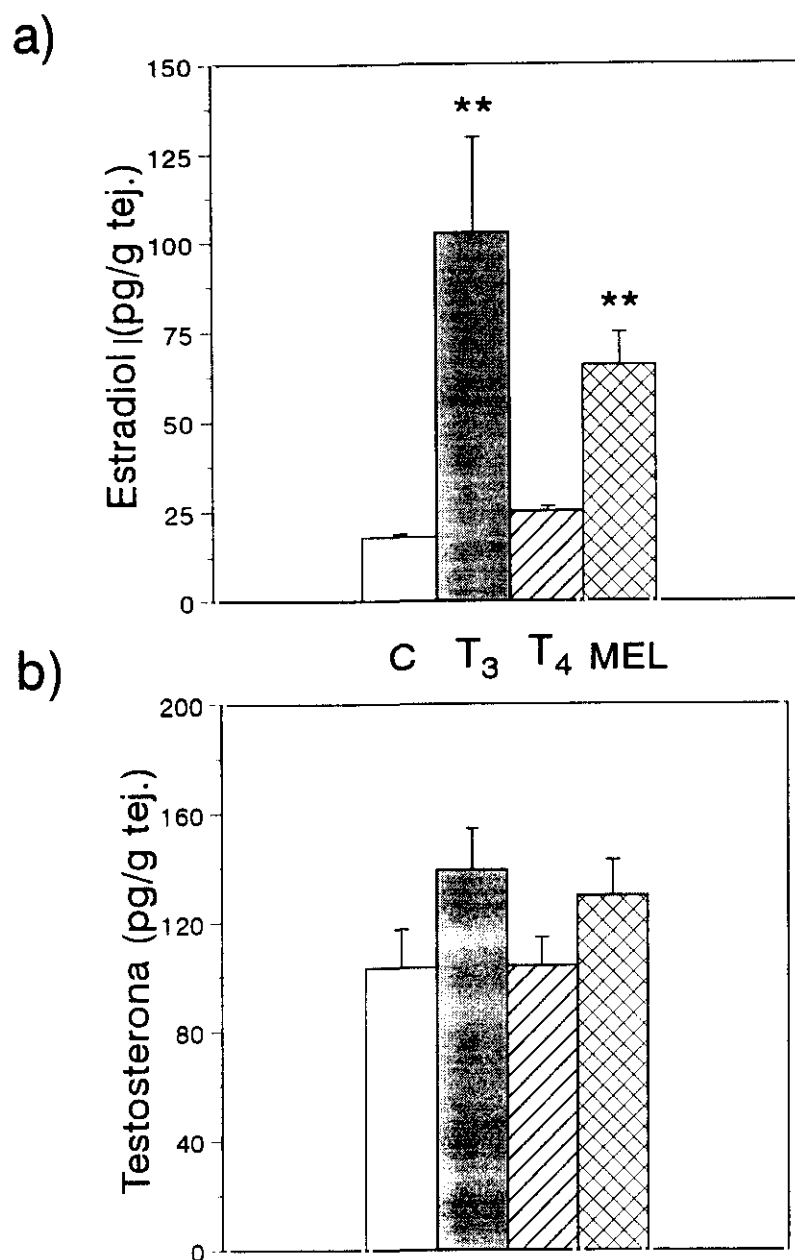
El tratamiento agudo con  $T_3$  (1 nM) induce un incremento ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $E_2$  en larvas prometamórficas (Fig. 43a), aunque no modifica significativamente la concentración de testosterona (Fig. 43b). El mismo tipo de resultados se observa como consecuencia del tratamiento agudo con MEL (0,5 mM). Por otra parte, el tratamiento con  $T_4$  (1 nM) no produce cambios significativos de las concentraciones de



**Figura 41.** Efecto del tratamiento agudo con T<sub>4</sub> y/o melatonina (MEL) y/o luz continua (24L) sobre la concentración de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub> y c) la relación T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> en larvas prometamórficas (XV TK) de *R. perezii*. Las larvas fueron tratadas con T<sub>4</sub> (0,1  $\mu$ M) y/o MEL (0,5 mM) por inmersión durante 12 h, correspondientes a la fase oscura del ciclo diario, y/o fueron privadas de una noche (24L), siendo sacrificadas al término de la misma. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=10). \* p < 0,05 respecto al control 24L; # p < 0,05; ## p < 0,01.



**Figura 42.** Efecto del tratamiento agudo con estradiol ( $E_2$ ) y testosterona (T) sobre la concentración de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  en larvas prometamórficas (XV TK) de *R. perezii*. Las larvas fueron tratadas con  $E_2$  y T ( $5 \mu M$ ) por inmersión durante 12 h, correspondientes a la fase oscura del ciclo diario, siendo sacrificadas al término de la misma. Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=10$ ). \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 43.** Efecto del tratamiento agudo con T<sub>3</sub>, T<sub>4</sub> y melatonina (MEL) sobre la concentración de a) estradiol y b) testosterona en larvas prometamórficas (XV TK) de *R. perezi*. Las larvas fueron tratadas con T<sub>3</sub> y T<sub>4</sub> (1 nM) y con MEL (0,5 mM) por inmersión durante 12 h, correspondientes a la fase oscura del ciclo diario, siendo sacrificadas al término de la misma. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=10). \*\* p<0,01.



esteroides gonadales (Fig. 43a,b). Existe una correlación positiva ( $r = 0,4171$ ,  $p < 0,025$ ) entre la concentración de  $E_2$  y testosterona.

## 4.2. Adultos.

### 4.2.1. RELACIÓN PINEAL-TIROIDES.

La **pinelectomía y ceguera** (Px+Cx) no provoca ninguna alteración de los parámetros plasmáticos (Fig. 44), ni durante el día ni durante la noche. En cuanto al contenido tiroideo de  $FT_3$  (Fig. 45a) y  $BT_3$  (Fig. 46a) tampoco se ve alterado por el tratamiento quirúrgico en ninguno de los dos momentos del fotociclo diario. Sin embargo, se observa un mayor contenido medio de  $FT_4$  (Fig. 45b) durante el día, aunque el ANOVA2 es no significativo ( $p > 0,05$ ), y un descenso ( $p < 0,01$ ) de  $BT_4$  (Fig. 46b) durante la noche comparado con los controles. Además, aparecen cambios día/noche de  $BT_4$  en el grupo Px+Cx. La relación  $FT_3/FT_4$  es menor ( $p < 0,01$ ) durante el día en el grupo de Px+Cx (Fig. 45c), mientras que la relación  $BT_3/BT_4$  no presenta cambios significativos (Fig. 46c).

Se observa una interacción significativa del tratamiento experimental y del momento del fotociclo diario en los casos del contenido tiroideo de  $BT_4$  y de la relación  $FT_3/FT_4$ .

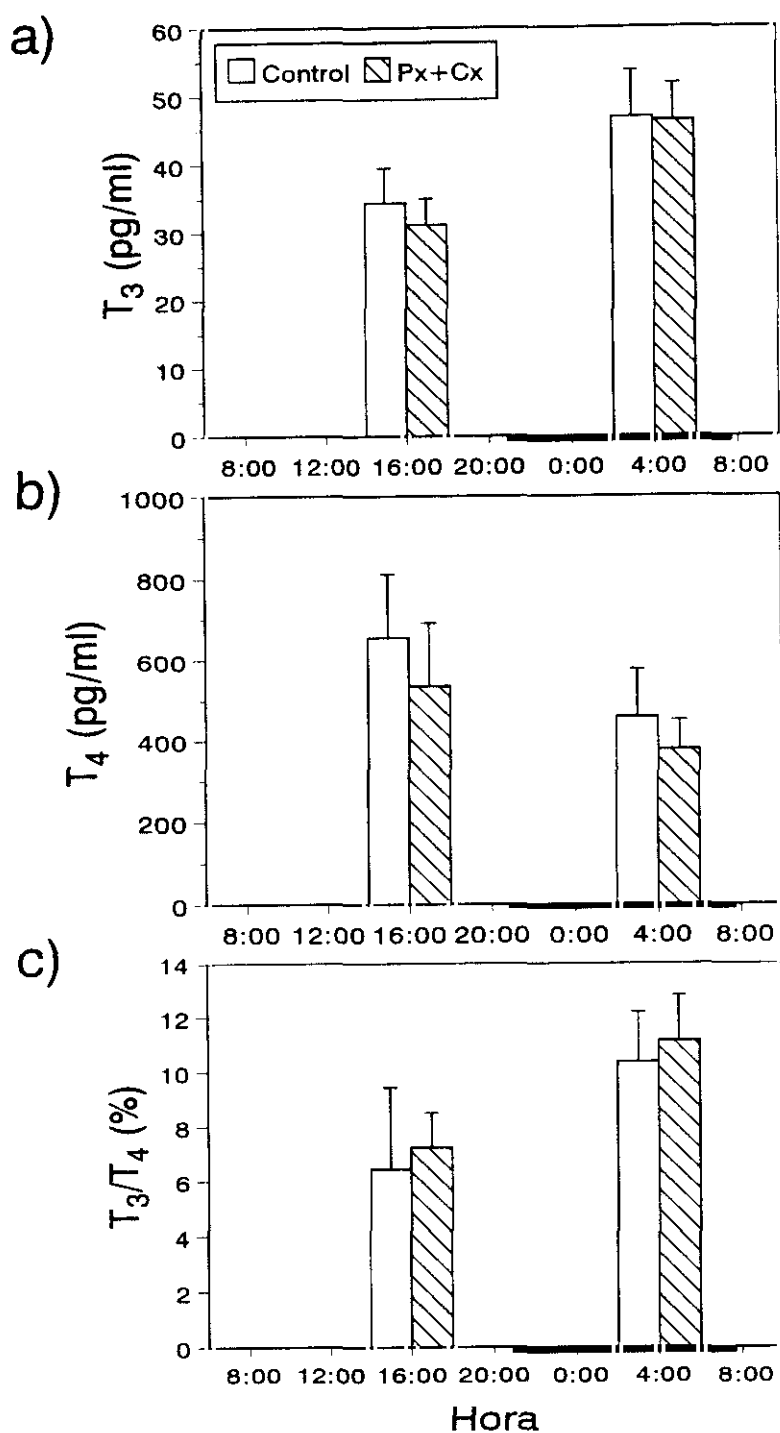
En cuanto a los índices organosomáticos (Tabla XVI), se observa un aumento ( $p < 0,0005$ ) del IHS como consecuencia del tratamiento quirúrgico. El IGS y el ICG también aumentan significativamente ( $p < 0,005$  y  $p < 0,01$ , respectivamente) en el grupo de Px+Cx.

### 4.2.2. RELACIÓN TIROIDES-GÓNADAS.

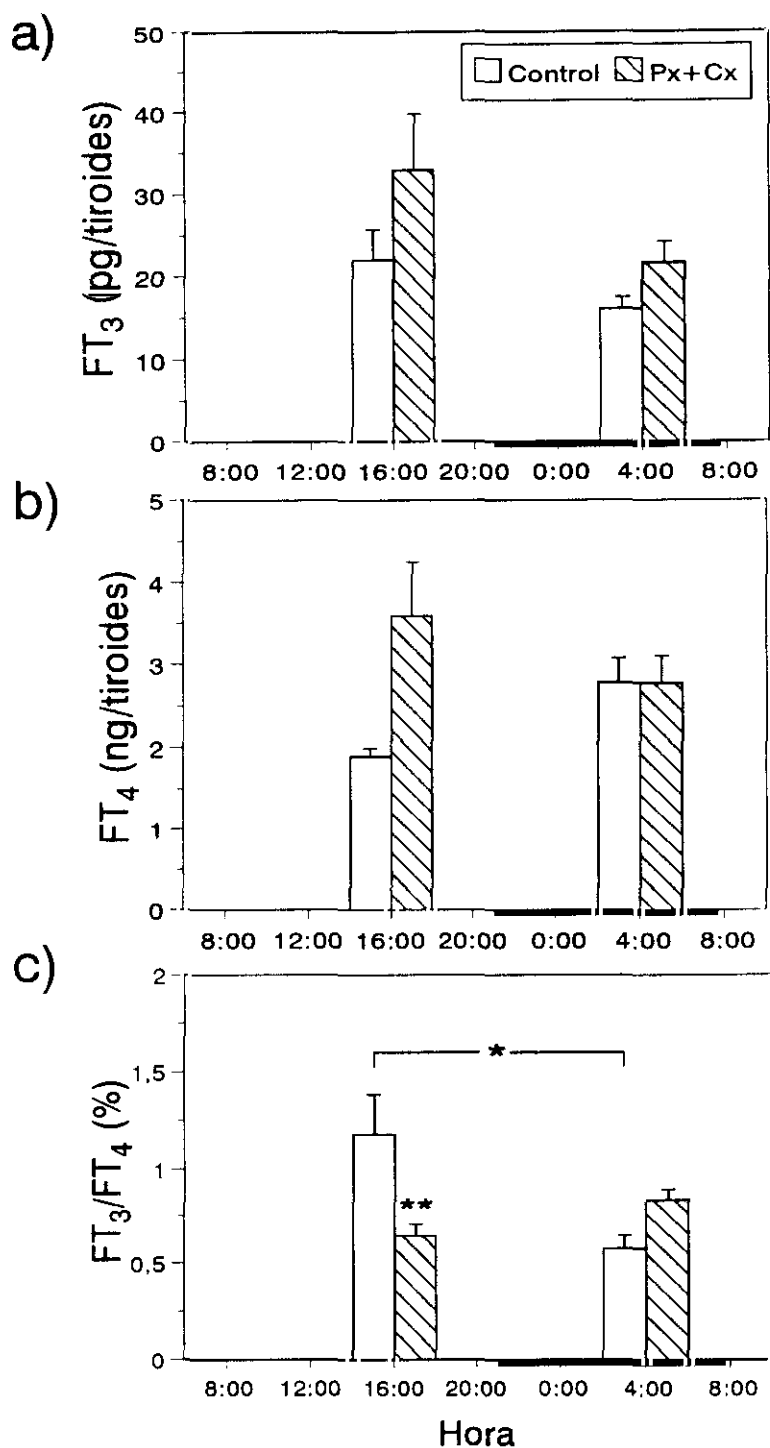
#### a) Efecto de la ovariectomía sobre la actividad tiroidea.

Tanto a los 7 como a los 30 días de la ovariectomía (Ovx) se observa un descenso significativo ( $p < 0,01$  y  $p < 0,001$ , respectivamente) de los niveles de  $E_2$  en plasma (Fig. 47a). Sin embargo, los niveles de progesterona no se modifican (Fig. 47b).

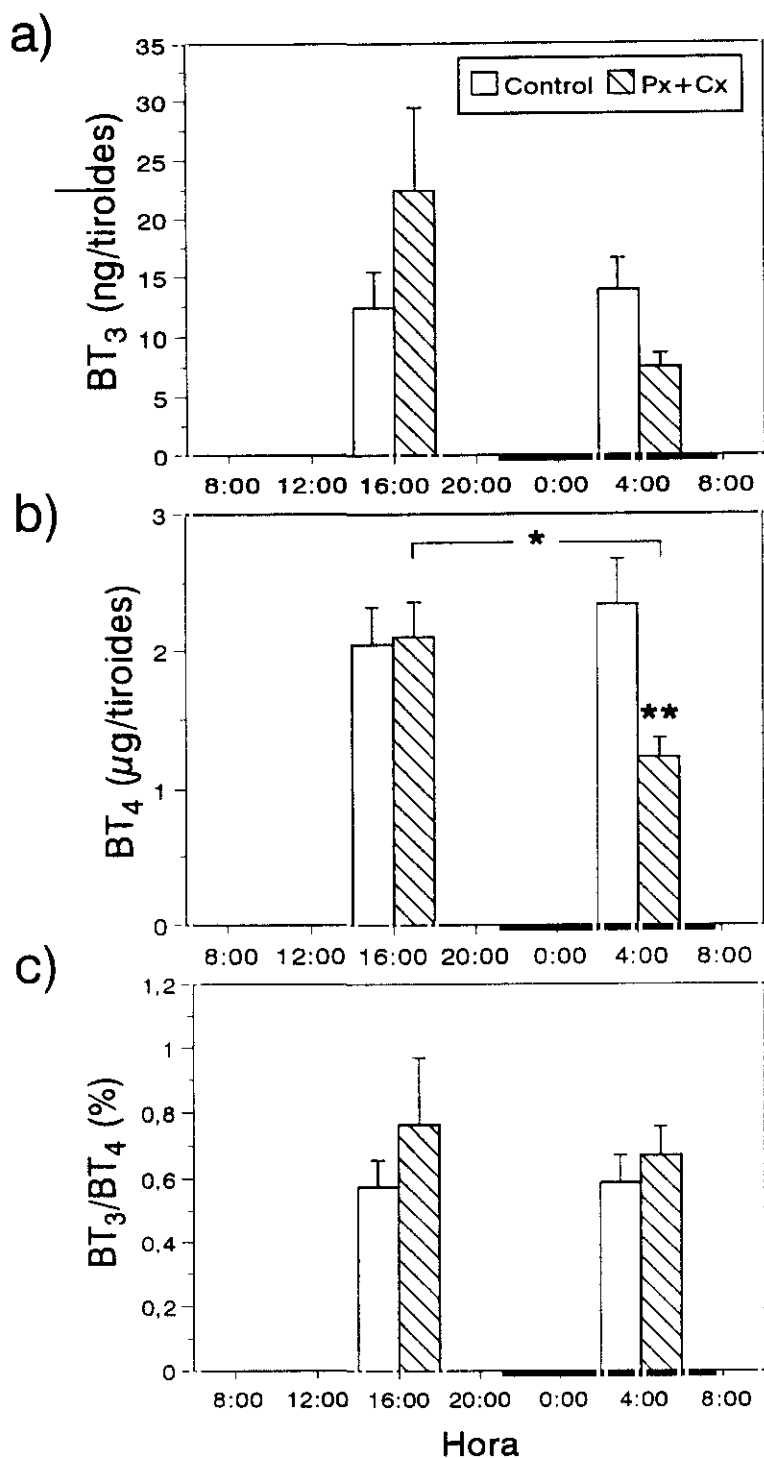
En la Fig. 48 se han representado los resultados obtenidos en relación a los niveles de HT circulantes. Podemos observar cómo a los 7 días se produce un descenso ( $p < 0,05$ ) en los niveles plasmáticos de  $T_3$ . A los 30 días los niveles medios son menores en el grupo OvX, pero la diferencia no es estadísticamente significativa (Fig. 48a). Los niveles de  $T_4$  en



**Figura 44.** Efecto de la pinealectomía y la ceguera (Px+Cx) sobre los niveles plasmáticos de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  plasmática en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales se sacrificaron a los 50 días de la Px+Cx en dos momentos del fotociclo diario. La barra sombreada representa la fase oscura del ciclo diario. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=8).



**Figura 45.** Efecto de la pinealectomía y ceguera (Px+Cx) sobre los contenidos tiroideos de a)  $FT_3$  y b)  $FT_4$  y c) la relación  $FT_3/FT_4$  tiroidea en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales se sacrificaron a los 50 días de la Px+Cx en dos momentos del fotociclo diario. La barra sombreada representa la fase oscura del ciclo diario. Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=8). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

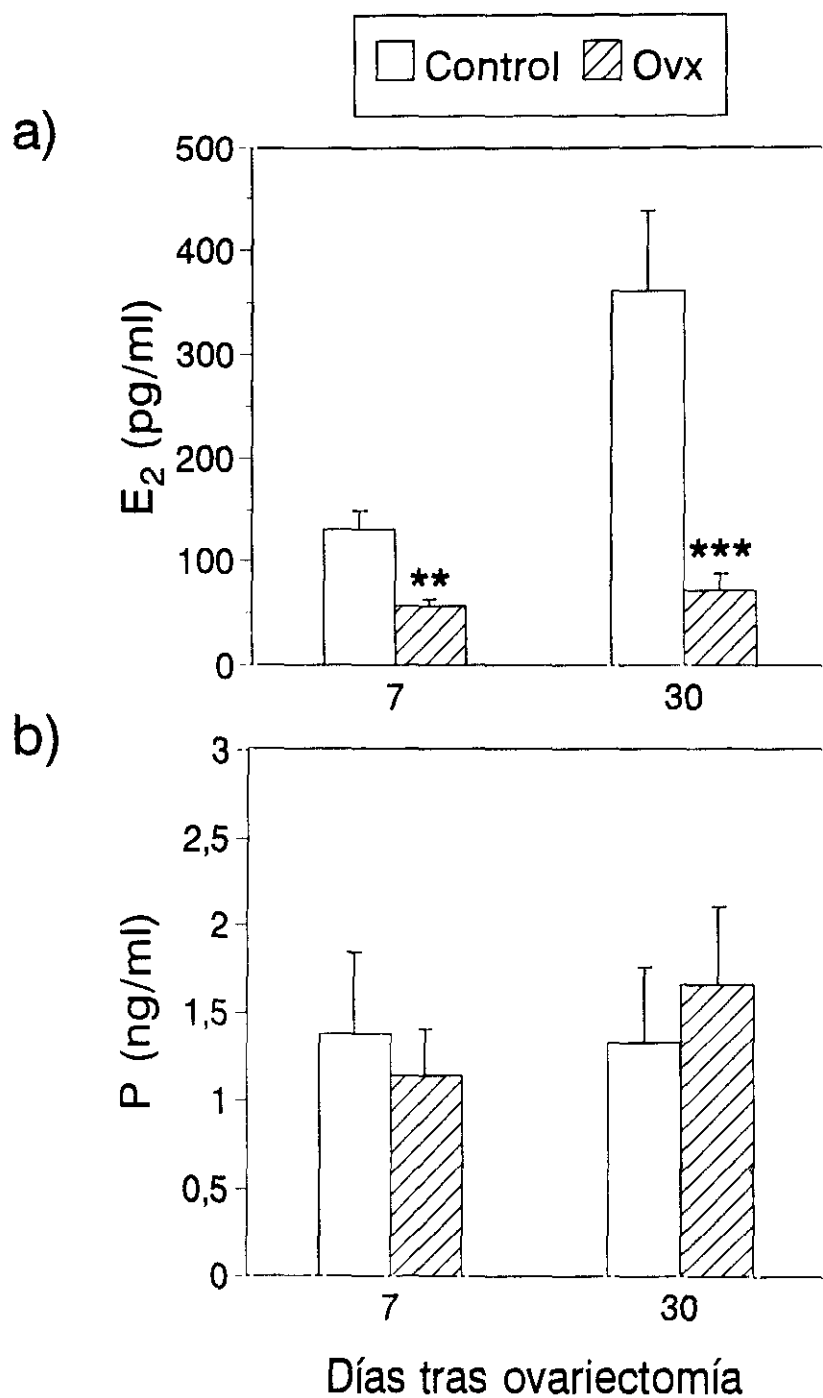


**Figura 46.** Efecto de la pinealectomía y ceguera (Px+Cx) sobre los contenidos tiroideos de a)  $BT_3$  y b)  $BT_4$  y c) la relación  $BT_3/BT_4$  tiroidea en hembras de *R. perezi* en verano. Los animales se sacrificaron a los 50 días de la Px+Cx en dos momentos del fotociclo diario. La barra sombreada representa la fase oscura del ciclo diario. Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=8$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .

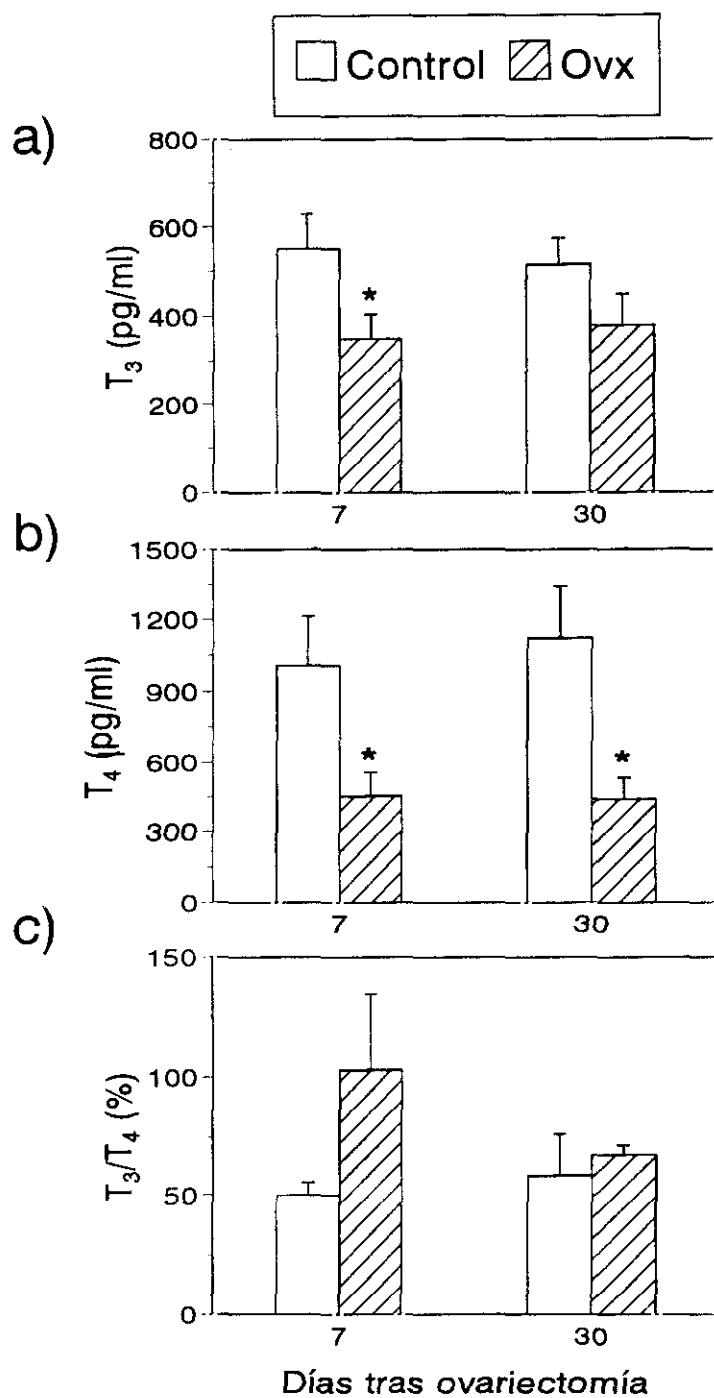
**Tabla XVI.** Índices organosomáticos (%) de hembras de *Rana perezii* a los 50 días de la pinealectomía y ceguera (Px+Cx).

	IHS	IGS	ICG
Control	3,66 ± 0,17 ***	1,31 ± 0,08 **	0,14 ± 0,06 *
Px+Cx	5,06 ± 0,23	2,10 ± 0,20	0,49 ± 0,09

IHS: índice hepatosomático, IGS: índice gonadosomático, ICG: índice de cuerpos grasos. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=10-18). Significación estadística: \*  $p < 0,01$ , \*\*  $p < 0,005$ , \*\*\*  $p < 0,0005$ .



**Figura 47.** Efecto de la ovariectomía (Ovx) sobre los niveles plasmáticos de a) estradiol y b) progesterona en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales se sacrificaron a los 7 y 30 días de la Ovx. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=10). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$ .



**Figura 48.** Efecto de la ovariectomía (Ovx) sobre los niveles plasmáticos de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) de la proporción  $T_3/T_4$  plasmática en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales se sacrificaron a los 7 y 30 días de la OvX. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=10). \*  $p < 0.05$ .

plasma también se ven reducidos ( $p < 0,05$ ) tras la Ovx a los 7 y 30 días (Fig. 48b). Por último, la relación  $T_3/T_4$  plasmática no es afectada por el tratamiento quirúrgico (Fig. 48c).

En lo que se refiere al contenido tiroideo de  $FT_3$  y  $FT_4$ , a los 7 días se observa un valor medio superior de ambos parámetros en el grupo Ovx con respecto a los controles, aunque estadísticamente no son diferentes. A los 30 días no aparecen diferencias entre los dos grupos experimentales (Fig. 49a,b). La relación  $FT_3/FT_4$  no presenta diferencias en ningún caso (Fig. 49c).

La Fig. 50 muestra los datos referentes al contenido de HT unidas a Tg. Podemos observar que a los 7 días se produce un incremento ( $p < 0,05$ ), tanto de  $BT_3$  (Fig. 50a) como de  $BT_4$  (Fig. 50b), en el grupo Ovx comparado con los controles. La relación  $BT_3/BT_4$  tampoco se modifica en este caso (Fig. 50c). A los 30 días no se observan diferencias significativas en ninguno de estos parámetros tiroideos (Fig. 50).

La ovariectomía produce un aumento ( $p < 0,05$ ) del IHS (Tabla XVII) a los 7 días, mientras que el ICG es menor que en los controles pero no de forma significativa. Por el contrario, a los 30 días la Ovx induce un descenso del IHS ( $p < 0,01$ ) y no se modifican el resto de los índices organosomáticos (ICG e IOS) aunque también se observa una tendencia a valores medios inferiores a los de los animales control.

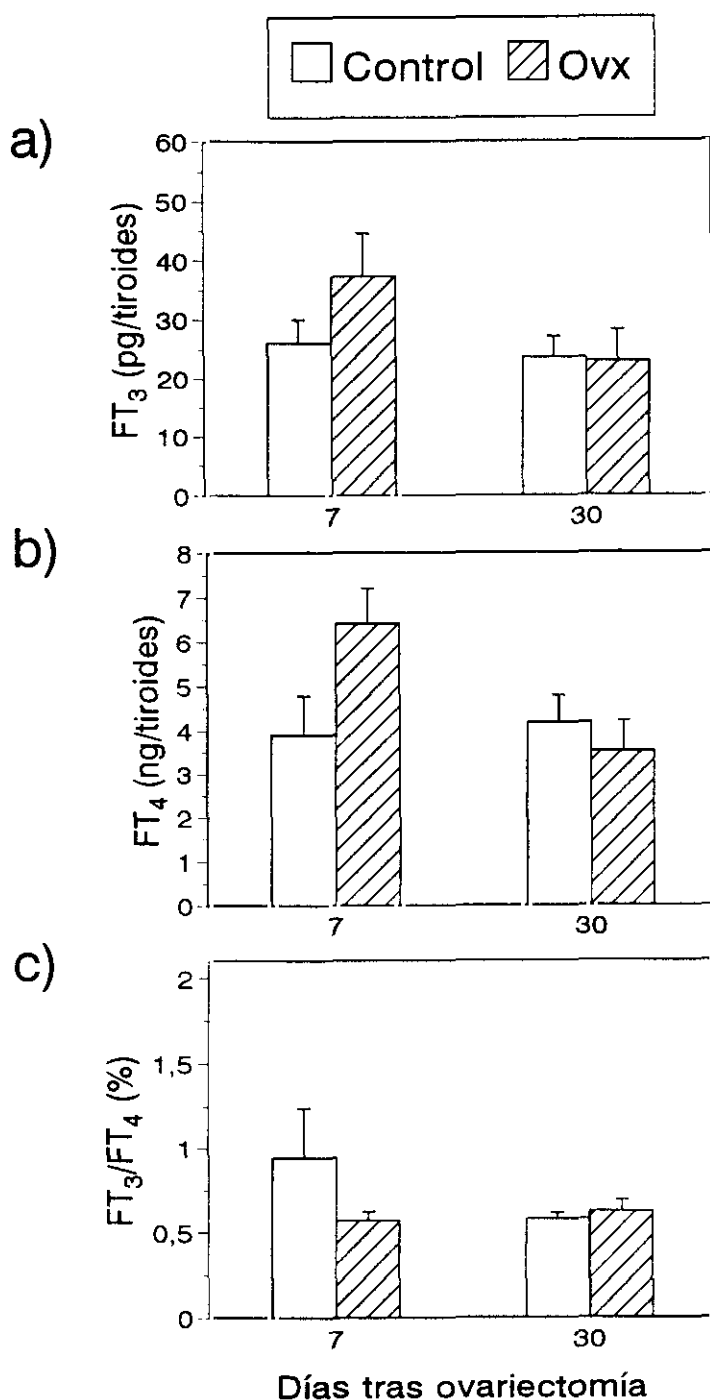
#### **b) Efecto del estradiol sobre la actividad tiroidea *in vitro*.**

El  $E_2$  ( $1 \mu M$ ) no modifica significativamente la producción de  $T_3$  y  $T_4$  tiroidea con respecto a los controles (Fig. 51) a ninguno de los tiempos de cultivo (3, 6, 9 y 12 horas). Se observa una evolución temporal en la producción de HT a lo largo del cultivo, de manera que la cantidad de  $T_3$  (Fig. 51a) en el medio disminuye con respecto a la preincubación y se mantiene posteriormente, mientras que la  $T_4$  (Fig. 51b) aumenta progresivamente hasta las 9 horas, sobre todo en los controles, y a las 12 horas disminuye hasta alcanzar valores similares a los observados en el primer intervalo de cultivo (3 horas). La proporción  $T_3/T_4$  evoluciona de forma similar a la  $T_3$  (Fig. 51c).

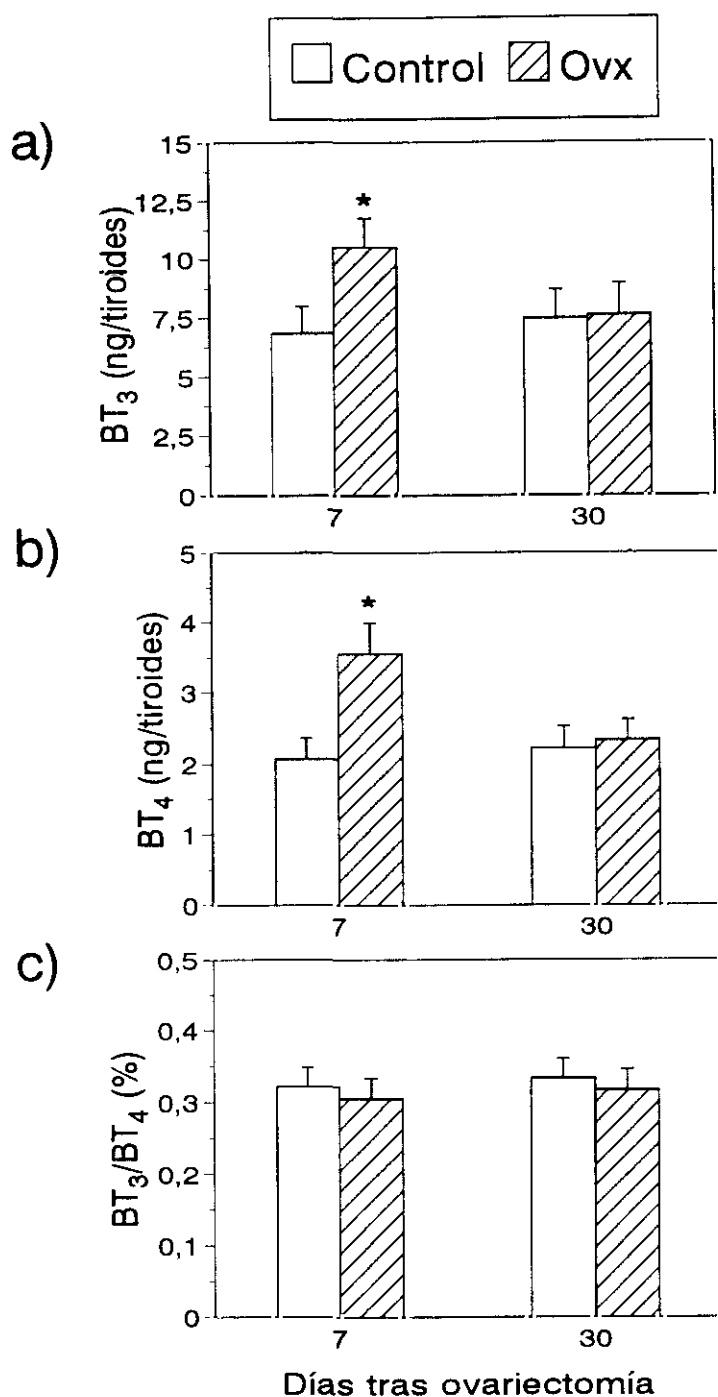
#### **c) Efecto de inhibidores tiroideos y de $T_3$ sobre los esteroides gonadales *in vivo*.**

La administración de ácido iopanoico (IOP, 0,5 mg/10 g peso corporal) y propiltiouracilo (PTU, 1 mg/10 g peso corporal) durante 15 días no fue efectiva para la consecución de un descenso en los niveles plasmáticos de  $T_3$  (Fig. 52a). Sin embargo, se





**Figura 49.** Efecto de la ovariectomía (Ovx) sobre los contenidos tiroideos de a)  $FT_3$  y b)  $FT_4$  y c) de la proporción  $FT_3/FT_4$  tiroidea en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales se sacrificaron a los 7 y 30 días de la OvX. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=10).



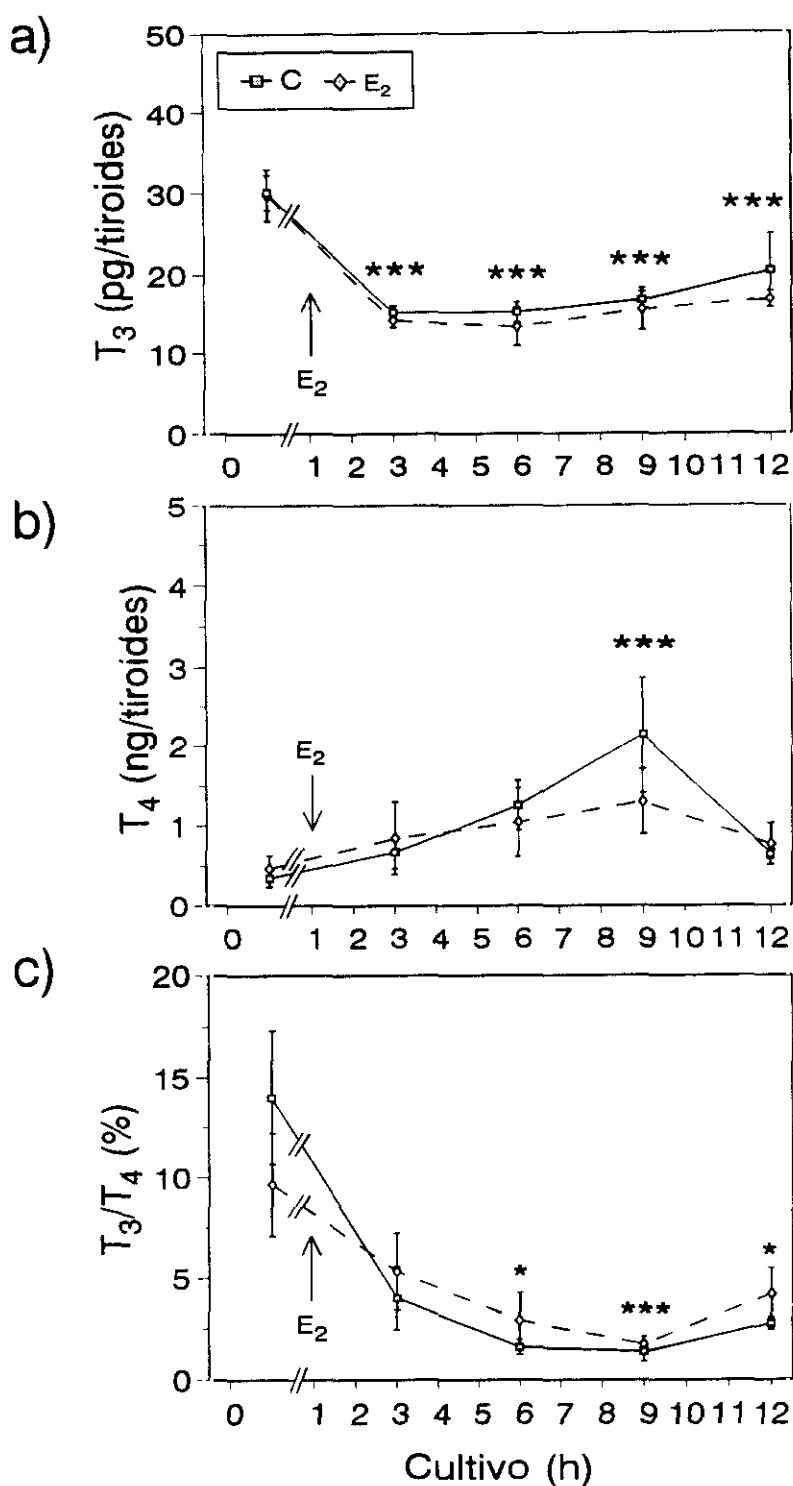
**Figura 50.** Efecto de la ovariectomía (Ovx) sobre los contenidos tiroideos de a)  $BT_3$  y b)  $BT_4$  y c) de la proporción  $BT_3/BT_4$  tiroidea en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales se sacrificaron a los 7 y 30 días de la OvX. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=10). \*  $p < 0,05$ .

**Tabla XVII.** Índices organosomáticos (%) de hembras de *Rana perezi* a los 7 y 30 días de la ovariectomía (Ovx).

	IHS	ICG	IOS
<b>7 días</b>			
Control	2,77 ± 0,15	0,52 ± 0,18	---
	*		
Ovx	3,45 ± 0,20	0,21 ± 0,06	---
<b>30 días</b>			
Control	3,21 ± 0,14	0,41 ± 0,10	5,02 ± 0,46
	**		
Ovx	2,14 ± 0,24	0,27 ± 0,18	4,16 ± 0,68

IHS: índice hepatosomático, ICG: índice de cuerpos grasos, IOS: índice oviductosomático, ---, no determinado. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=10). Significación estadística:

\*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 51.** Efecto del estradiol (E<sub>2</sub>) sobre la producción tiroidea de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub> y c) la proporción T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> de *R. perezii*. Los tiroides procedentes de hembras de *R. perezii* se cultivaron durante 12 h con o sin E<sub>2</sub> (1  $\mu$ M) renovándose el medio de cultivo cada 3 horas. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=7). \* p<0,05; \*\*\* p<0,005 respecto a los niveles iniciales de preincubación.

produce un descenso significativo ( $p < 0,01$ ) de la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 52c), que parece indicar una inhibición de la desyodación periférica, que viene confirmado por el aumento ( $p < 0,01$ ) observado en los niveles circulantes de  $T_4$  (Fig. 52b). En el grupo tratado con IOP+PTU y  $T_3$ , lógicamente, se observa un incremento significativo ( $p < 0,005$ ) de  $T_3$  en plasma (Fig. 52a). También aumenta ( $p < 0,01$ ) el contenido tiroideo de  $T_3$  (fracción libre, Fig. 53a, y fracción unida, Fig. 54a) y el contenido de  $BT_4$  (Fig. 54b). La relación  $FT_3/FT_4$  se incrementa como resultado del tratamiento con  $T_3$  (Fig. 53c), pero no la  $BT_3/BT_4$  (Fig. 54c). El tratamiento con IOP+PTU no altera ningún otro parámetro tiroideo (Fig. 53 y 54), salvo el ya citado. Existe una correlación positiva entre los niveles de  $T_3$  plasmáticos y el contenido tiroideo de  $FT_3$  y  $BT_3$  ( $r = 0,753$ ,  $p < 0,0001$  y  $r = 0,568$ ,  $p < 0,01$ , respectivamente), así como entre el contenido tiroideo libre y unido de  $T_3$  ( $r = 0,462$ ,  $p < 0,05$ ).

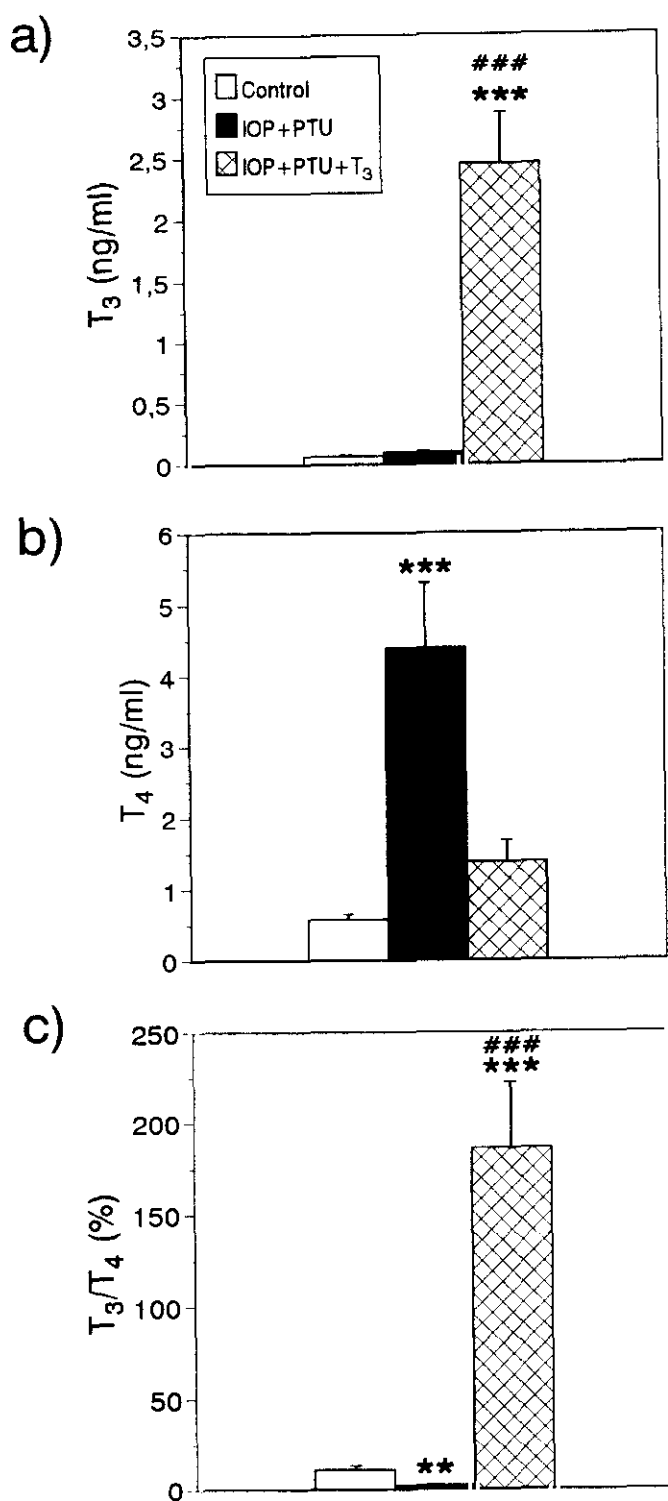
En la Fig. 55 podemos observar que los niveles circulantes de  $E_2$  no se ven afectados significativamente por ninguno de los tratamientos experimentales.

Los índices organosomáticos se recogen en la Tabla XVIII, donde podemos apreciar que los índices hepatosomático y gonadosomático (IHS e IGS) no se modifican, mientras que el índice de cuerpos grasos (ICG) aumenta ( $p < 0,05$ ) en el grupo tratado con IOP+PTU+ $T_3$  con respecto al tratado sólo con IOP+PTU. El índice oviductosomático (IOS) también aumenta ( $p < 0,05$ ) en el grupo IOP+PTU comparado con el control y el tratamiento conjunto con  $T_3$  revierte los efectos de los inhibidores tiroideos.

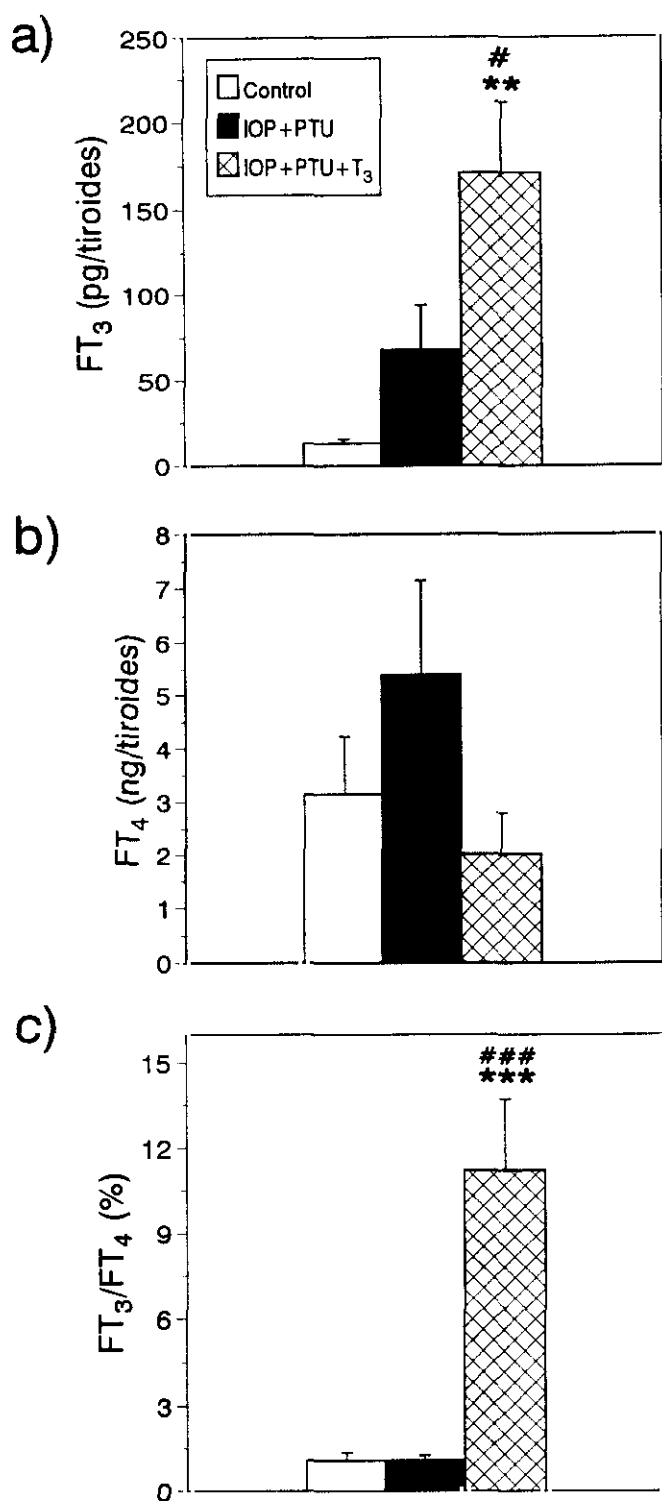
#### **d) Efecto de $T_3$ sobre la producción de esteroides ováricos *in vitro*.**

La adición de homogeneizado de hipófisis (0,5 eq de hipófisis/ml) al medio de cultivo induce un incremento ( $p < 0,05$ ) de la concentración de  $E_2$  en el medio a las 9 y las 12 horas de cultivo (Fig. 56a), mientras que la GCH (50 UI/ml) disminuye significativamente ( $p < 0,05$ ) la producción de  $E_2$  a las 6 horas. El tratamiento con  $T_3$  (10 pM) induce un descenso de la concentración de  $E_2$  a las 6 ( $p < 0,01$ ), 9 ( $p < 0,05$ ) y 12 horas ( $p < 0,01$ ).

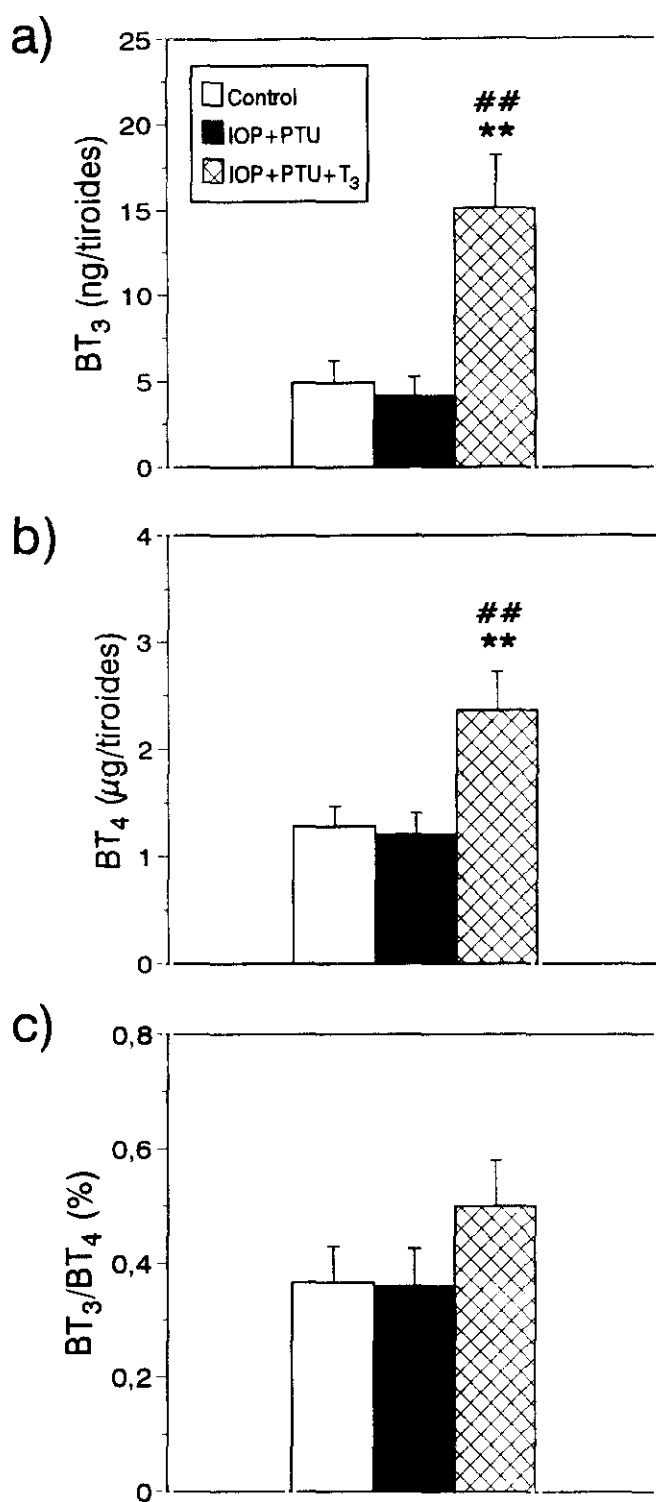
La concentración de testosterona en el medio, sólo se evaluó a las 3 y las 9 horas de cultivo (Fig. 56b). Se observa una fuerte estimulación de la liberación de testosterona al medio inducida por el extracto de hipófisis durante el primer período de cultivo (3 horas), efecto que desaparece a las 9 horas. Los ovocitos tratados con  $T_3$  presentan niveles de testosterona en el medio inferiores ( $p < 0,05$ ) a los observados en los controles a las 9 horas



**Figura 52.** Efecto del tratamiento con ácido iopanoico y propiltiouracilo (IOP+PTU) y/o  $T_3$  sobre los niveles plasmáticos de **a)**  $T_3$  y **b)**  $T_4$  y **c)** la proporción  $T_3/T_4$  plasmática en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales fueron inyectados diariamente con IOP (0,5 mg/10 g peso) y PTU (1 mg/10 g peso) y/o  $T_3$  (2  $\mu$ g/10 g peso) durante 15 días. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=8). \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,005$  respecto a los controles; ###  $p < 0,005$  respecto al grupo tratado con IOP+PTU.

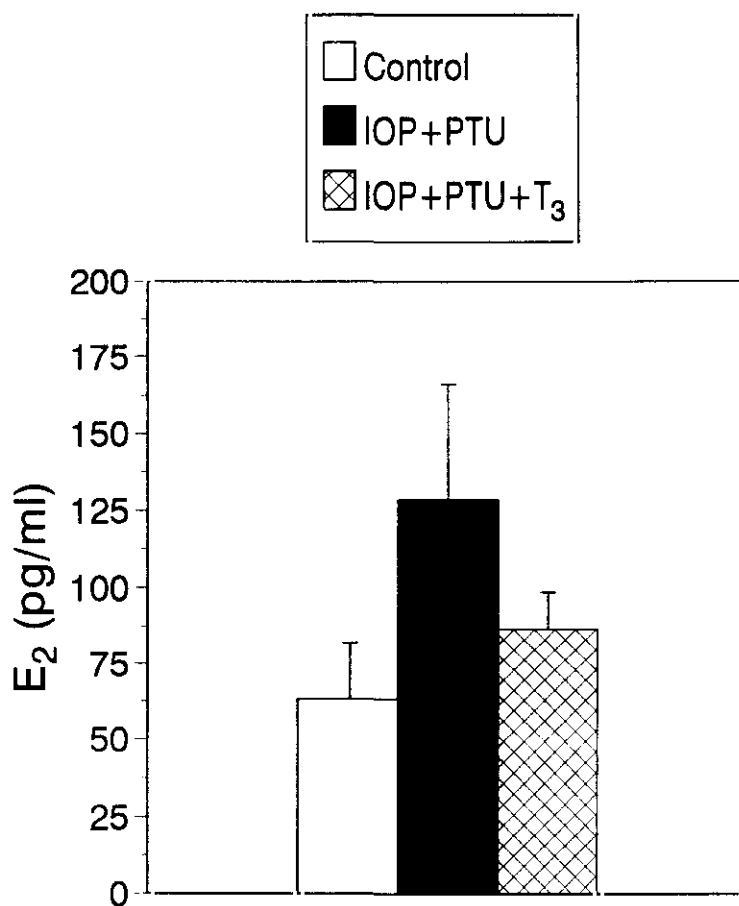


**Figura 53.** Efecto del tratamiento con ácido iopanoico y propiltiouracilo (IOP+PTU) y/o T<sub>3</sub> sobre los contenidos tiroideos de **a)** FT<sub>3</sub> y **b)** FT<sub>4</sub> y **c)** la proporción FT<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub> tiroidea en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales fueron inyectados diariamente con IOP (0,5 mg/10 g peso) y PTU (1 mg/10 g peso) y/o T<sub>3</sub> (2 µg/10 g peso) durante 15 días. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=8). \*\* p < 0,01; \*\*\* p < 0,005 respecto a los controles; # p < 0,05; ### p < 0,005 respecto al grupo tratado con IOP+PTU.



**Figura 54.** Efecto del tratamiento con ácido iopanoico y propiltiouracilo (IOP+PTU) y/o  $T_3$  sobre los contenidos tiroideos de a)  $BT_3$  y b)  $BT_4$  y c) la proporción  $BT_3/BT_4$  tiroidea en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales fueron inyectados diariamente con IOP (0,5 mg/10 g peso) y PTU (1 mg/10 g peso) y/o  $T_3$  (2 µg/10 g peso) durante 15 días. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=8). \*\*  $p < 0,01$ ; respecto a los controles; ##  $p < 0,01$  respecto al grupo tratado con IOP+PTU.



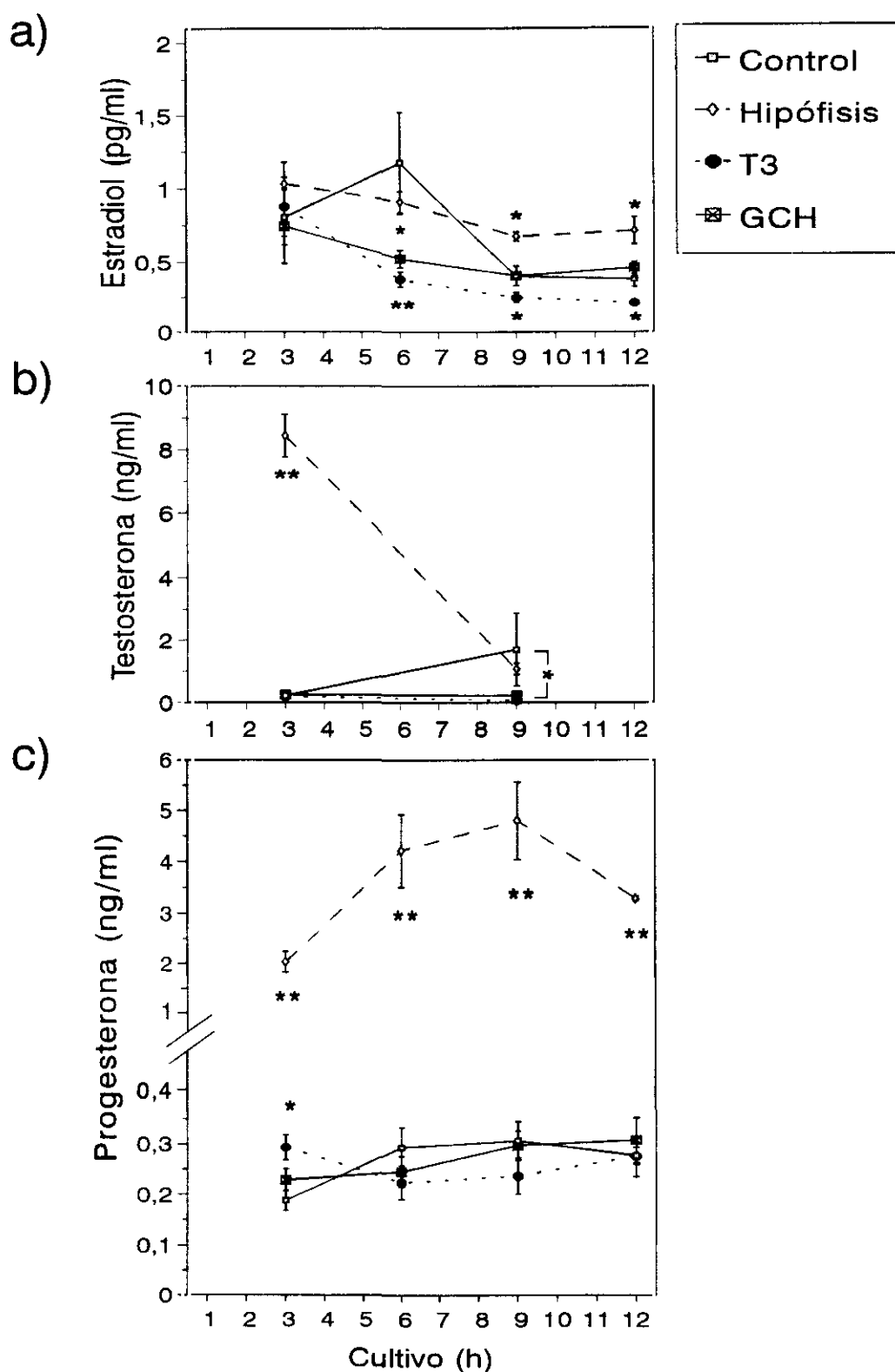


**Figura 55.** Efecto del tratamiento con ácido iopanoico y propiltiouracilo (IOP+PTU) y/o  $T_3$  sobre los niveles plasmáticos de  $E_2$  en hembras de *R. perezii* en verano. Los animales fueron inyectados diariamente con IOP (0,5 mg/10 g peso) y PTU (1 mg/10 g peso) y/o  $T_3$  (2  $\mu$ g/10 g peso) durante 15 días. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=8).

**Tabla XVIII.** Indices organosomáticos (%) de hembras de *Rana perezi* a los 15 días del tratamiento con inhibidores de desyodasas y T<sub>3</sub>.

	IHS	IGS	ICG	IOS
Control	2,73±0,25	1,43±0,20	0,26±0,08	0,75±0,14
				*
IOP+PTU	2,74±0,13	1,41±0,12	0,06±0,03	2,33±0,58
			*	
IOP+PTU+T <sub>3</sub>	2,74±0,20	1,47±0,32	0,51±0,17	1,56±0,60

IHS: índice hepatosomático, IGS: índice gonadosomático, ICG: índice de cuerpos grasos, IOS: índice oviductosomático. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=8). Significación estadística: \* p < 0,05.



**Figura 56.** Efecto del tratamiento con T<sub>3</sub> (10 pM), homogeneizado de hipófisis (0,5 equ/ml) o gonadotropina coriónica humana (GCH, 50 UI/ml) sobre la producción de a) estradiol, b) testosterona y c) progesterona por ovocitos de *R. perezi*. Los ovocitos se cultivaron durante 12 h y se tomaron muestras del medio a intervalos de 3 h. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=5). \* p<0,05; \*\* p<0,01 respecto de los controles en el mismo intervalo de cultivo.

de cultivo. La GCH no afecta a la liberación de testosterona al medio.

La cantidad de progesterona en el medio de cultivo (Fig. 56c) también está significativamente elevada ( $p < 0,01$ ) en el grupo tratado con hipófisis a lo largo de todo el cultivo, mientras que el grupo tratado con GCH no difiere del control. Sin embargo, la  $T_3$  produce un aumento ( $p < 0,05$ ) de la concentración de progesterona en el medio a las 3 horas con respecto al control.

## 5. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA EN *R. perezii*.

### 5.1. Larvas.

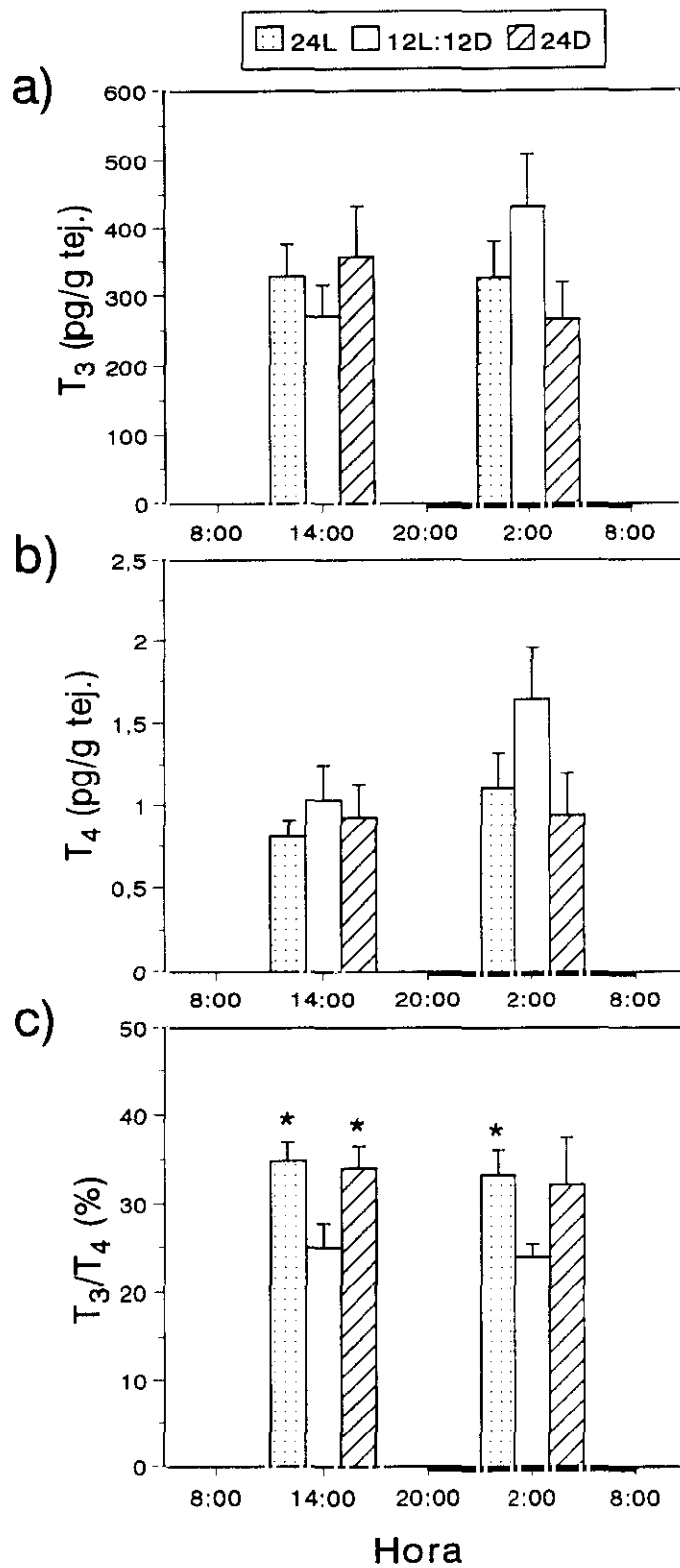
#### 5.1.1. FOTOPERÍODO.

En la Fig. 57 podemos observar que las condiciones extremas de iluminación, 24L y 24D, no alteran las concentraciones de  $T_3$  (Fig. 57a) y  $T_4$  (Fig. 57b) en ninguno de los dos momentos del fotociclo diario evaluados. Sin embargo, se aprecia un incremento ( $p < 0,05$ ) de la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 57c) en los dos grupos experimentales, en relación a los controles, durante el día; mientras que sólo 24L induce un aumento significativo ( $p < 0,05$ ) de esta proporción durante la noche, si bien el valor medio de 24D también es superior al de los controles.

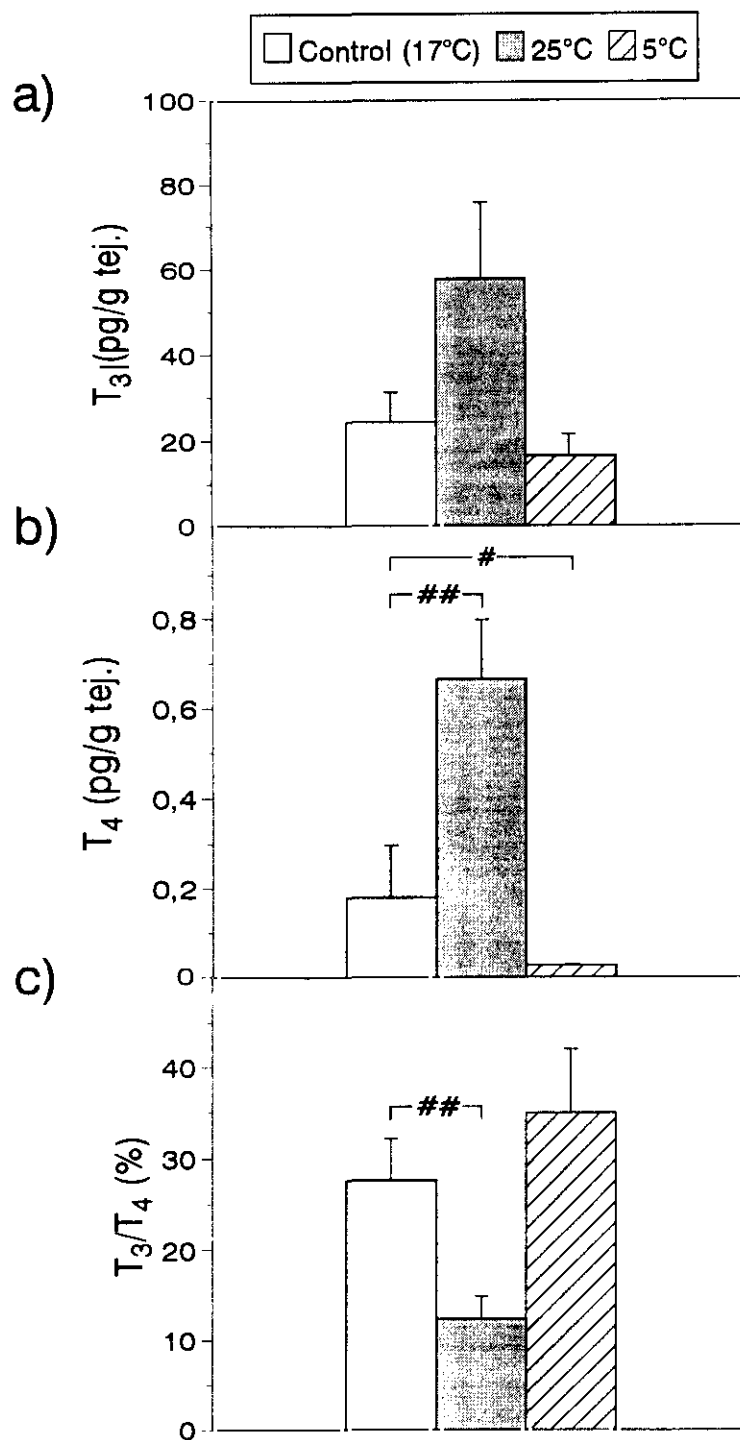
#### 5.1.2. TEMPERATURA.

En un experimento preliminar, realizado únicamente en la mitad de la fase luminosa del fotociclo diario, se observa que el tratamiento térmico agudo ( $25^\circ\text{C}$  y  $5^\circ\text{C}$ ) no produce diferencias en la concentración de  $T_3$  (Fig. 58a) con respecto al control ( $17^\circ\text{C}$ ). Sin embargo, en la Fig. 58b se puede apreciar que la temperatura alta induce un aumento significativo ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $T_4$ , mientras que la temperatura baja reduce ( $p < 0,05$ ) la concentración de esta hormona. La relación  $T_3/T_4$  es menor ( $p < 0,01$ ) en el grupo de temperatura alta comparado con los controles (Fig. 58c).

Posteriormente se llevó a cabo un segundo experimento en dos momentos del fotociclo diario, mediodía y medianoche (véase Materiales y Métodos, 2.8.5.1.b). En este caso observamos el mismo efecto agudo de la temperatura durante el día, es decir, no hay



**Figura 57.** Efecto de la oscuridad (24D) y luz (24L) constantes sobre la concentración de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  en larvas prometamórficas (XVI-XVII TK) de *R. perezii*. Las larvas se mantuvieron bajo las condiciones experimentales durante una semana y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=10). \* p < 0,05 respecto de los controles (12L:12D).



**Figura 58.** Efecto agudo de la temperatura sobre la concentración de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  en larvas prometamórficas (XV TK) de *R. perezii*. Las larvas se mantuvieron bajo las condiciones experimentales durante 24 h y se sacrificaron al mediodía. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  ( $n=10$ ). #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

diferencias entre los distintos grupos en cuanto a la concentración de  $T_3$  (Fig. 59a) y se produce un incremento ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $T_4$  en el grupo de temperatura alta ( $30^\circ\text{C}$ ), mientras que la temperatura baja ( $10^\circ\text{C}$ ) disminuye ( $p < 0,01$ ) dicho parámetro (Fig. 59b) comparado con el control ( $20^\circ\text{C}$ ). También aparece una reducción de la relación  $T_3/T_4$  en el grupo de temperatura alta respecto al control (Fig. 59c). Por la noche tampoco se producen cambios en la concentración de  $T_3$  como resultado del tratamiento experimental (Fig. 59a) y se sigue observando la elevación ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $T_4$  (Fig. 59b) y el descenso ( $p < 0,01$ ) de  $T_3/T_4$  (Fig. 59c) producidos por la temperatura alta. Sin embargo, no se observan cambios significativos en la concentración de  $T_4$  en el grupo de temperatura baja, mientras que se produce una elevación de la proporción  $T_3/T_4$  ( $p < 0,01$ ) con respecto al control (Fig. 59b,c). Por último, se aprecia la existencia de cambios día/noche de la concentración de  $T_3$  (Fig. 59a) con valores nocturnos inferiores (control,  $p < 0,01$ ; temperatura alta,  $p < 0,05$ ). El grupo control también muestra una concentración de  $T_4$  nocturna inferior ( $p < 0,01$ ) a la diurna (Fig. 59b).

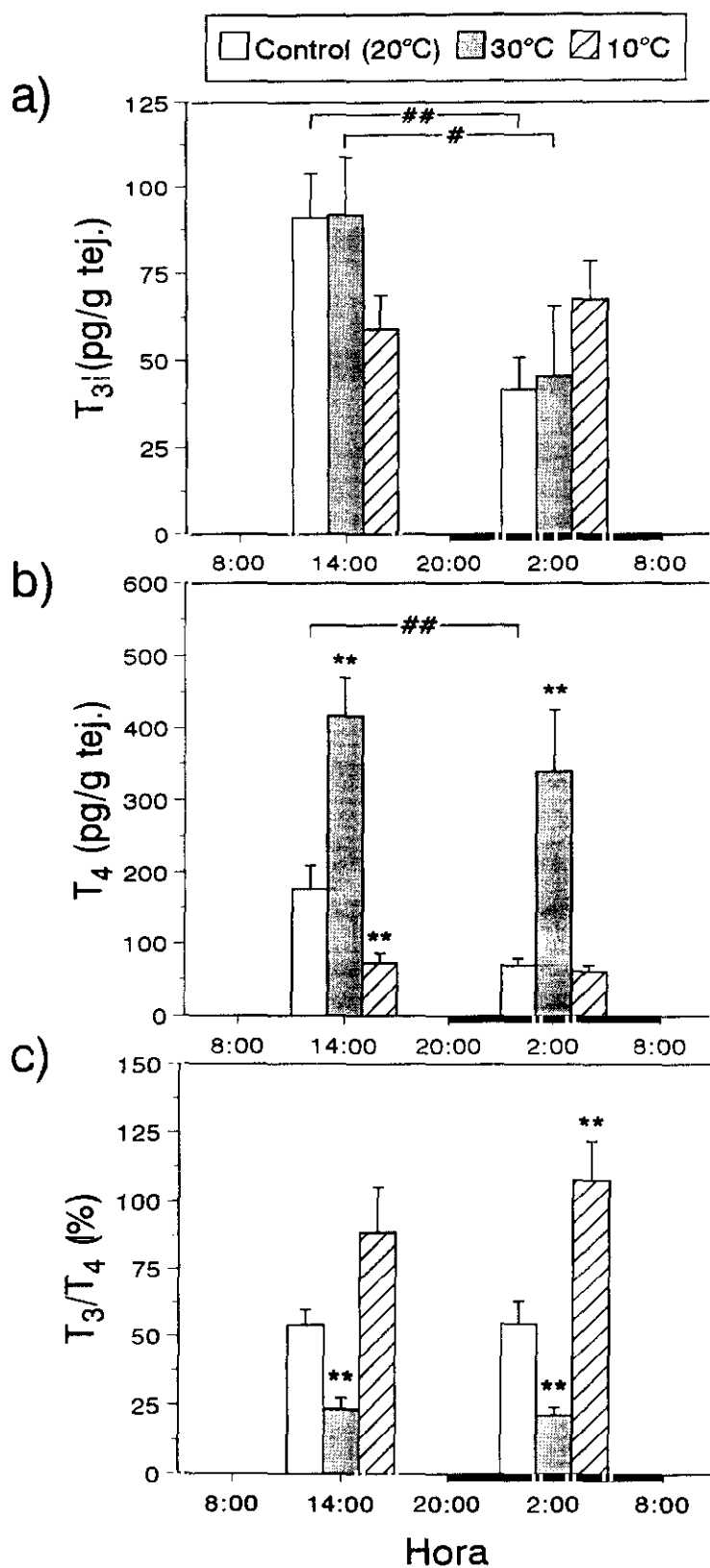
### 5.1.3. ALIMENTACIÓN.

Los resultados obtenidos en el estudio del efecto de la alimentación sobre la función tiroidea en larvas de *R. perezii* se recogen en la Fig. 60. Podemos observar que el ayuno (una semana) disminuye ( $p < 0,01$ ) la concentración de  $T_3$  (Fig. 60a) tanto al mediodía como a la medianoche. La realimentación no altera esta situación ni a las 2 ni a las 14 horas. En cuanto a la concentración de  $T_4$  (Fig. 60b), los cambios se mantienen en el mismo sentido durante la noche, pero no hay diferencias entre los grupos durante el día. Durante la noche se observa un incremento ( $p < 0,01$ ) de la concentración de  $T_4$  y un descenso ( $p < 0,01$ ) de la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 60c) con respecto a los valores diurnos.

## 5.2. Adultos.

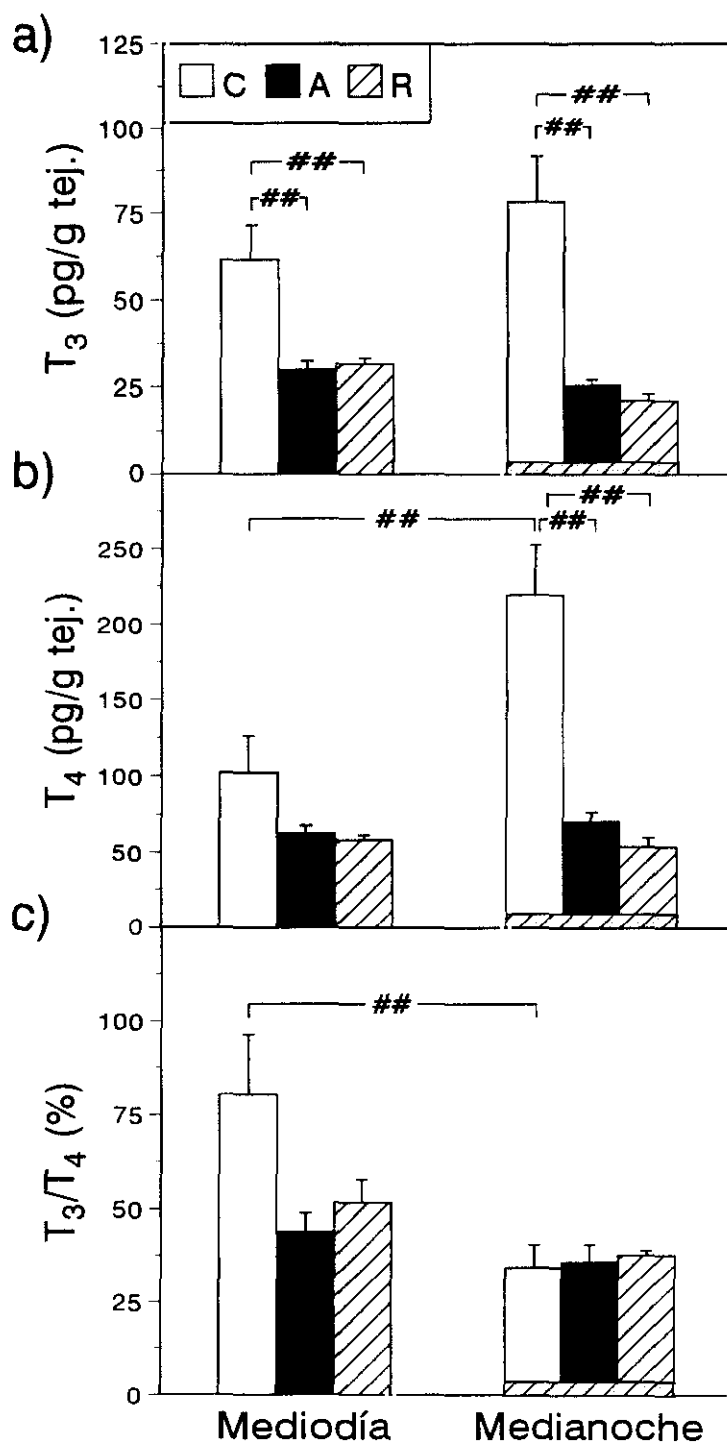
### 5.2.1. FOTOPERÍODO.

La ausencia de fotoperíodo, es decir, tanto 24L como 24D, no altera significativamente ninguno de los parámetros plasmáticos (Fig. 61) ni durante el día ni durante la noche. En lo que se refiere al contenido tiroideo de  $FT_3$  (Fig. 62a), se observan valores superiores ( $p < 0,05$ ) a los del control en el grupo de 24D durante el día. Además, este grupo presenta un contenido de  $FT_3$  durante la noche inferior al diurno ( $p < 0,05$ ). El

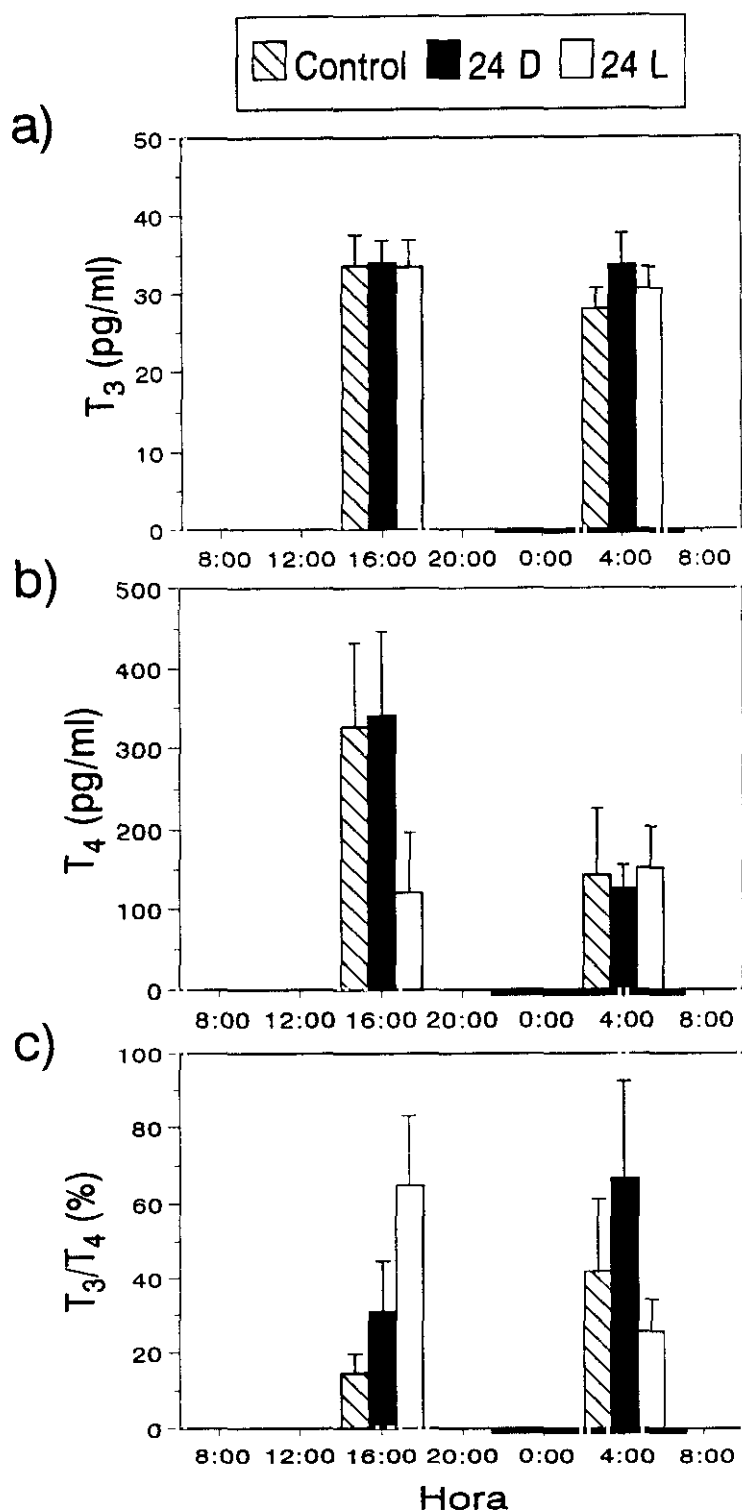


**Figura 59.** Efecto agudo de la temperatura sobre la concentración de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  en larvas prometamórficas (XV TK) de *R. perezii*. Las larvas se mantuvieron bajo las condiciones experimentales durante 24 h y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=9). \*\* p < 0,01 respecto al control; # p < 0,05; ## p < 0,01. La barra negra representa la fase oscura del ciclo diario.





**Figura 60.** Efecto agudo del ayuno (A) y la realimentación (R) sobre la concentración de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  en larvas prometamórficas (XIII TK) de *R. perezii*. Las larvas se mantuvieron en ayuno durante una semana al cabo de la cual se le proporcionó alimento (R) y se sacrificaron al mediodía (2 h después) y a la medianoche (14 h después). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=9). ## p<0,01.



**Figura 61.** Efecto de la luz y oscuridad constantes (24L y 24D, respectivamente) sobre los niveles plasmáticos de a)  $T_3$  y b)  $T_4$  y c) la relación  $T_3/T_4$  plasmática en adultos de *R. perezii*. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante tres semanas y se sacrificaron en dos momentos del fotociclo diario. Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-9$ ). La barra negra representa la fase oscura del ciclo diario.

contenido de  $FT_4$  (Fig. 62b) no presenta variaciones significativas, aunque los cambios son en el mismo sentido que los observados en  $FT_3$ . La relación  $FT_3/FT_4$  en el grupo de 24L es superior ( $p < 0,05$ ) a la del grupo control durante el día (Fig. 62c), y presenta valores nocturnos menores ( $p < 0,05$ ). Por último, el contenido de  $BT_3$  y  $BT_4$ , así como su relación, no presentan variaciones como consecuencia de los tratamientos experimentales (Fig. 63).

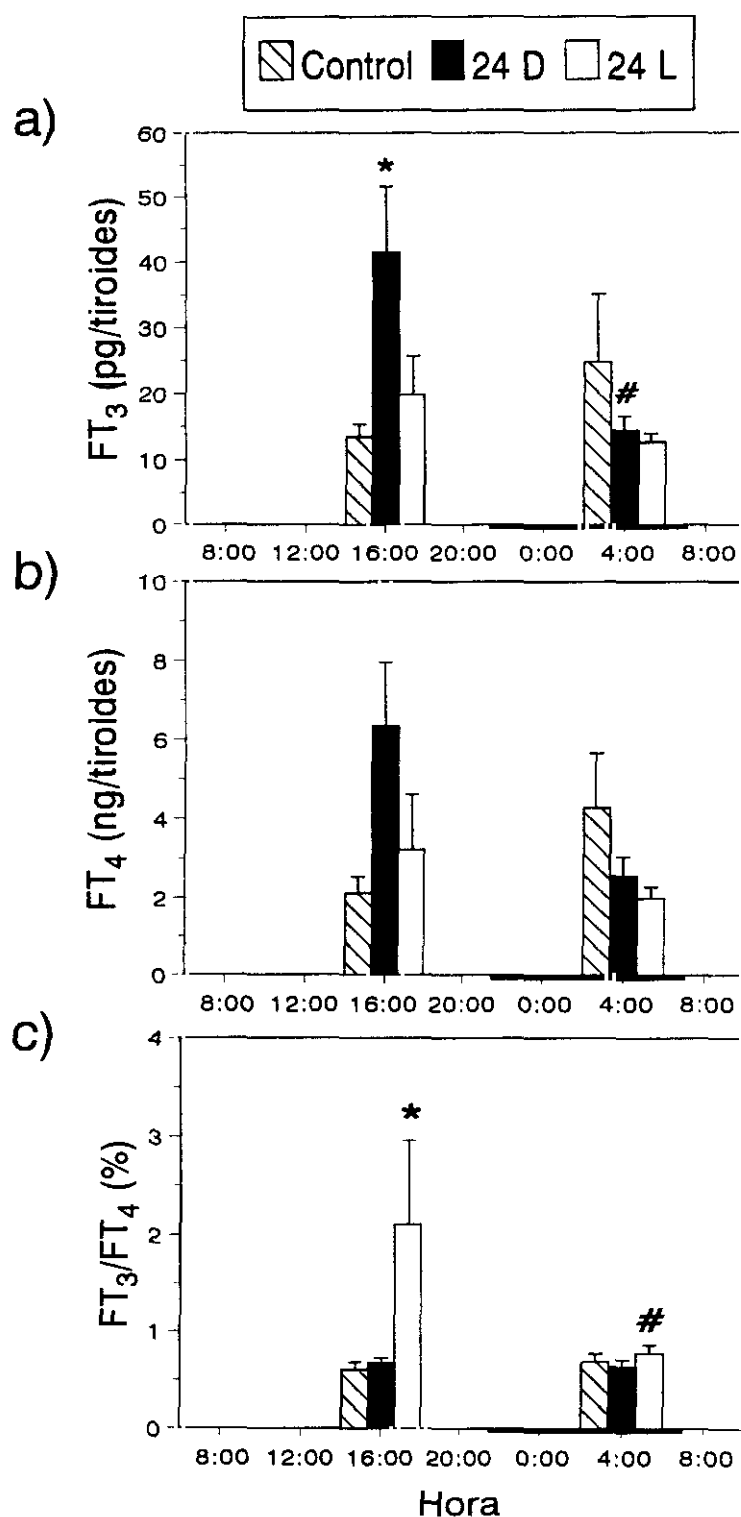
### 5.2.2. TEMPERATURA.

El estudio del efecto crónico de la temperatura sobre la función tiroidea de individuos adultos de *R. perezi*, se llevó a cabo en dos épocas del año, verano e invierno. En la Fig. 64 se resumen los datos referentes a los niveles plasmáticos de  $T_3$  en las dos estaciones y se observa que en verano (Fig. 64a) no existen diferencias entre las dos temperaturas analizadas en ninguno de los dos momentos del fotociclo diario estudiados. Por el contrario, en invierno (Fig. 64b) el grupo aclimatado a  $25^\circ\text{C}$  presenta a media noche niveles de  $T_3$  superiores ( $p < 0,05$ ) a los observados en el grupo aclimatado a baja temperatura ( $5^\circ\text{C}$ ). Por otra parte, se aprecia una elevación ( $p < 0,05$ ) de los niveles nocturnos en el grupo de temperatura alta con respecto a los valores diurnos. Si comparamos los niveles circulantes de  $T_3$  en las dos épocas del año, se observa que en verano son mayores ( $p < 0,01$ ) que en invierno para las dos temperaturas, tanto de día como de noche.

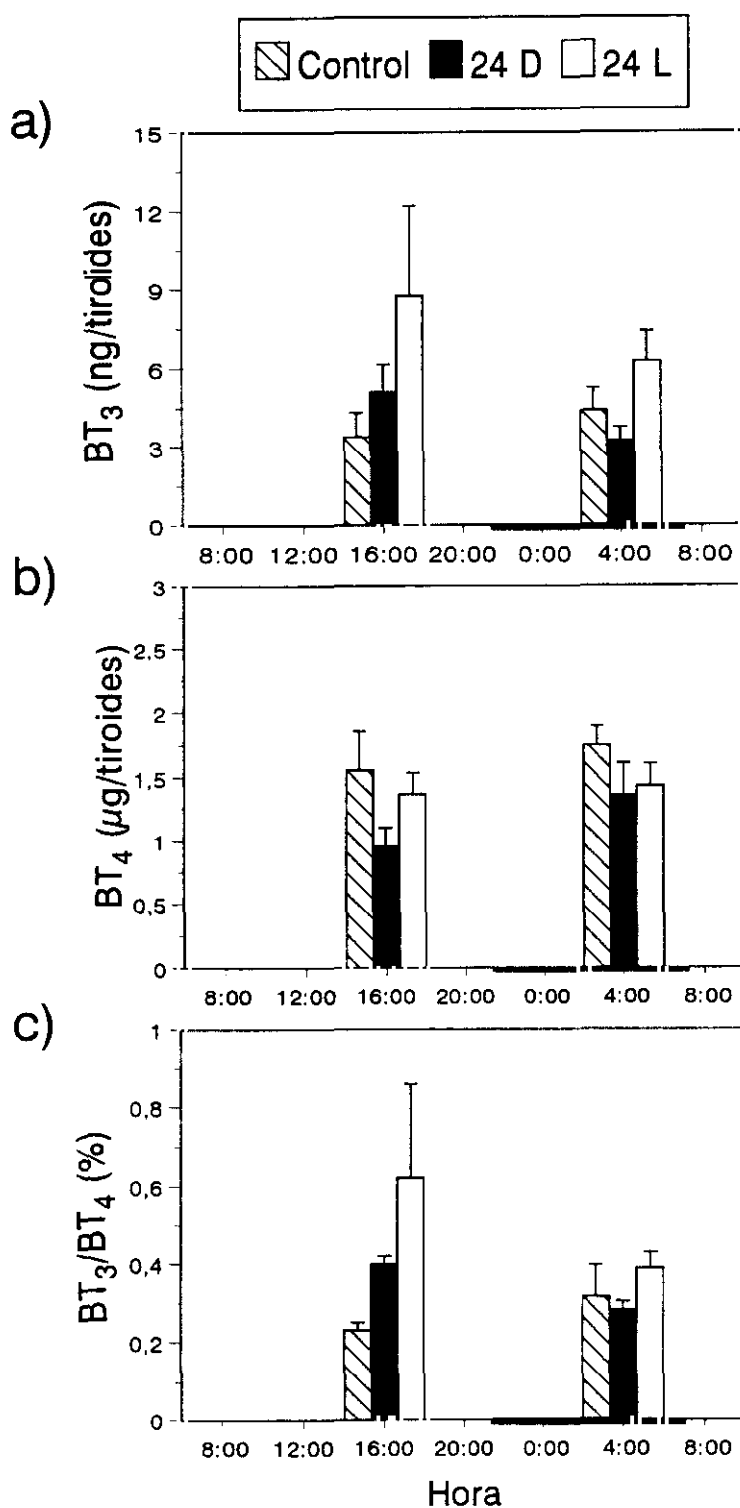
En cuanto a la contribución relativa de cada uno de los efectos principales que influyen sobre los niveles plasmáticos de  $T_3$ , se calculó a partir de los valores hormonales transformados logarítmicamente y se tomó como grupo de referencia ( $\bar{x}_R$ ) el que presentó los niveles menores de  $T_3$  (invierno,  $25^\circ\text{C}$ , mediodía). El modelo matemático obtenido en este caso, debido a que sólo influyen significativamente la estación y el momento del fotociclo diario, viene expresado por la siguiente ecuación:

$$\begin{aligned} \ln(T_3) &= \ln(\bar{x}_R) + \text{Estación} + \text{Fotociclo} \\ \ln(T_3) &= 3,451 + 1,062 + 0,395 \\ &\quad (\text{verano}) \quad (\text{medianoche}) \end{aligned}$$

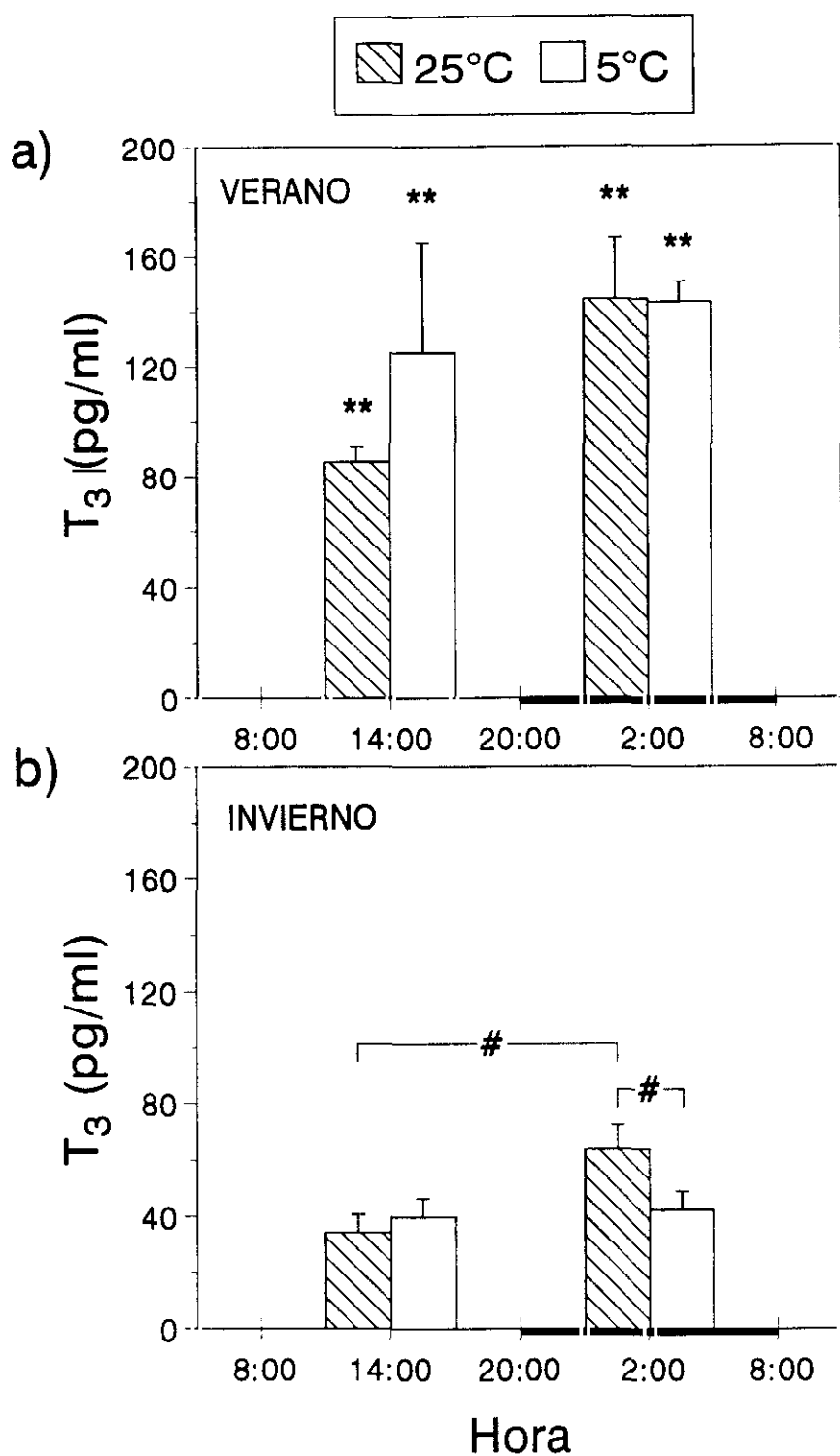
De esta forma, la media esperada de cada grupo experimental se obtuvo mediante la suma del efecto de los factores que definen cada grupo (entre paréntesis) a la media del grupo de referencia.



**Figura 62.** Efecto de la luz y oscuridad constantes (24L y 24D, respectivamente) sobre los contenidos tiroideos de a) FT<sub>3</sub> y b) FT<sub>4</sub> y c) la relación FT<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub> tiroidea en adultos de *R. perezii*. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante tres semanas y se sacrificaron en dos momentos del fotociclo diario. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=7-9). \* p<0,05 respecto al control; # p<0,05 respecto al correspondiente grupo diurno. La barra negra representa la fase oscura del ciclo diario.



**Figura 63.** Efecto de la luz y oscuridad constantes (24L y 24D, respectivamente) sobre los contenidos tiroideos de a)  $BT_3$  y b)  $BT_4$  y c) la relación  $BT_3/BT_4$  tiroidea en adultos de *R. perezii*. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante tres semanas y se sacrificaron en dos momentos del fotociclo diario. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. ( $n=7-9$ ). La barra negra representa la fase oscura del ciclo diario.



**Figura 64.** Efecto crónico de la temperatura sobre los niveles plasmáticos de  $T_3$  en adultos de *R. perezii* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-10$ ). \*\*  $p < 0,01$  respecto al correspondiente grupo de invierno; #  $p < 0,05$ .

Como puede observarse en la Tabla XIX, el residuo estándar, es decir la diferencia normalizada entre los valores observados y los esperados, es inferior a la unidad en todos los casos, indicando la validez del ajuste. Por otra parte, como ya señalamos en el apartado de Materiales y Métodos (2.8.5.2.b), esta ecuación nos permite calcular el incremento de los niveles de  $T_3$  atribuible a cada uno de los factores por separado, y expresarlo a continuación como el coeficiente a aplicar al grupo de referencia, de manera que, una vez transformados a la escala lineal, los sumandos de la anterior ecuación indicarían incrementos ( $\times$ ) multiplicativos sobre el grupo de referencia ( $\bar{x}_R$ ). En los casos en los que algún componente de la ecuación fuera negativo estaría indicando descensos ( $\div$ ) con respecto al grupo basal.

El efecto más potente lo ejerce la estación del año (Tabla XX), de manera que se observa un incremento de 2,89 veces en los niveles plasmáticos de  $T_3$  cuando el experimento se realiza en verano, independientemente de la temperatura de aclimatación que no influye significativamente, si bien, como hemos visto anteriormente, el grupo de 25°C de invierno presenta valores superiores a los del grupo de 5°C a la medianoche debido al efecto del fotociclo que influye de manera más modesta sobre los niveles de  $T_3$  ( $\times 1,48$ ).

La Fig. 65 muestra los valores de  $T_4$  plasmáticos y podemos ver que, tanto en verano como en invierno, el grupo aclimatado a 25°C presenta valores superiores (verano:  $p < 0,05$ ; invierno:  $p < 0,01$ ) durante la noche en relación al grupo de temperatura baja, mientras que durante el día las diferencias van en el mismo sentido pero sólo son estadísticamente significativas en invierno ( $p < 0,01$ ). Por otra parte, los valores diurnos de  $T_4$  en plasma del grupo aclimatado a 5°C en verano son superiores ( $p < 0,05$ ) a los de invierno.

Para calcular la potencia de los efectos principales que influyen sobre los niveles de  $T_4$  plasmática (Tabla XXI) seguimos el procedimiento explicado en el caso de la  $T_3$ . En esta ocasión el grupo de referencia, es decir el de menor media, fue el de los animales aclimatados a 5°C durante el invierno y sacrificados a la medianoche. Se incluye el intervalo de los residuos estándares (mínimo, máximo) como indicador de la validez del ajuste del modelo.

En este caso la estación del año en que se realizó la aclimatación no influye de manera significativa ( $p = 0,071$ ) aunque como hemos visto el grupo de 5°C de verano al mediodía presenta valores superiores a los de su homónimo de invierno. La temperatura de aclimatación (25°C), sin embargo, induce un aumento importante ( $\times 3,43$ ) en los niveles de

**Tabla XIX.** Diferencias entre los valores observados y esperados (residuos) tras la aplicación del modelo obtenido del MANOVA de los valores de  $T_3$  plasmática (transformados logarítmicamente) de individuos adultos de *R. perezii*, aclimatados a 5° y 25°C en dos épocas del año.

Estación	Fotociclo	Tª aclim. (°C)	Media <sub>o</sub>	Media <sub>e</sub>	Residuo	Residuo estándar
Verano						
	L	25	4,431	4,513	-0,082	-0,165
	L	5	4,899	4,908	-0,009	-0,018
	D	25	4,590	4,513	0,077	0,154
	D	5	4,957	4,908	0,049	0,098
Invierno						
	L	25	3,402	3,451	-0,049	-0,099
	L	5	4,088	3,846	0,242	0,488
	D	25	3,523	3,451	0,072	0,145
	D	5	3,600	3,846	-0,246	-0,495

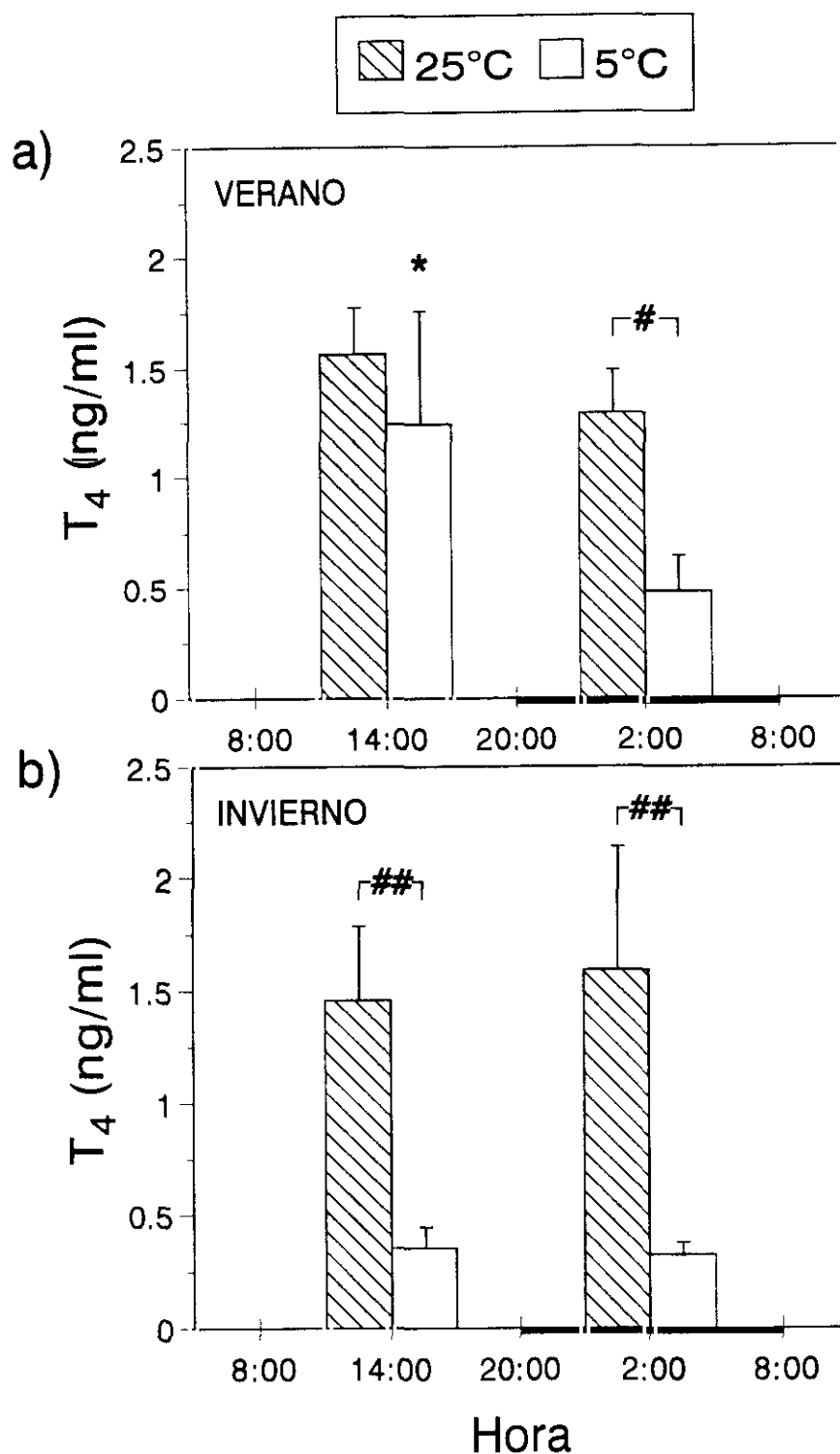
Media<sub>o</sub>: media observada, Media<sub>e</sub>: media esperada, L: sacrificio al mediodía, D: sacrificio a la medianoche.

**Tabla XX.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre los niveles plasmáticos de  $T_3$  de *R. perezii*. Grupo basal o de referencia: Invierno, 25°C, mediodía.

FACTOR	$\Delta T_3$
Verano	$\times 2,89$
5°C	N.S.
Medianoche	$\times 1,48$
<u>Interacciones</u>	N.S.

$\Delta T_3$  indica las veces que cada factor está incrementando los niveles hormonales con respecto a los del grupo de referencia. N.S.: no significativo estadísticamente.





**Figura 65.** Efecto crónico de la temperatura sobre los niveles plasmáticos de  $T_4$  en adultos de *R. perezi* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-10$ ). \*  $p < 0,05$  respecto al correspondiente grupo de invierno; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

$T_4$ , mientras que el fotociclo no influye significativamente.

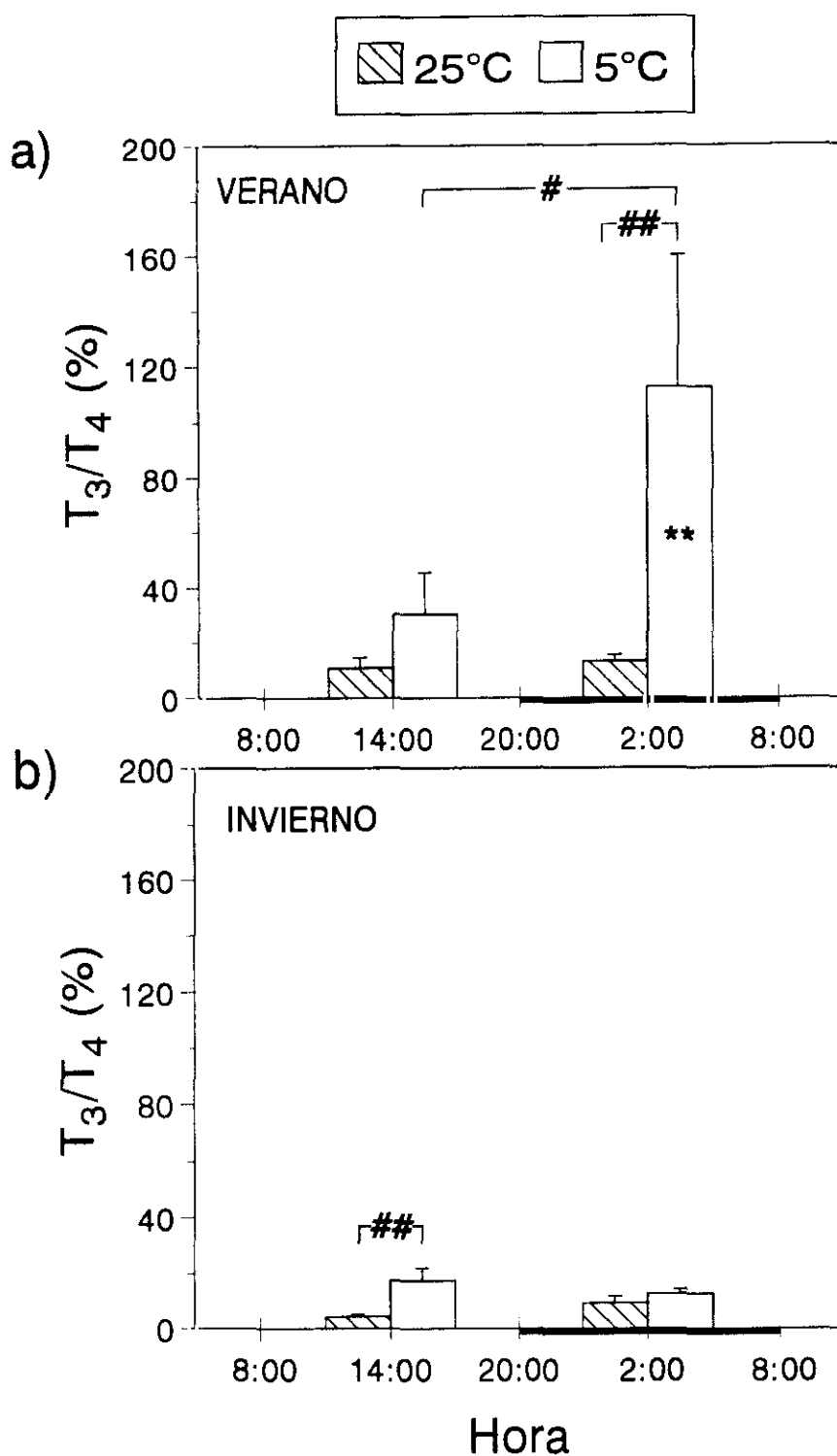
**Tabla XXI.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre los niveles plasmáticos de  $T_4$  en *R. perezii*. Grupo de referencia: Invierno, 5°C, medianoche.

FACTOR	$\Delta T_4$
Verano	N.S.
25°C	$\times 3,43$
Mediodía	N.S.
<u>Interacciones</u>	N.S.
Intervalo de los residuos	[-0,274 +0,810]

$\Delta T_4$  indica las veces que cada factor está incrementando los niveles hormonales con respecto a los del grupo de referencia. N.S.: no significativo.

En cuanto a la relación  $T_3/T_4$  plasmática (Fig. 66), se produce un incremento nocturno en el grupo de 5°C de verano siendo significativamente diferente ( $p < 0,05$ ) de los valores diurnos en el mismo grupo y de los valores nocturnos del grupo de 25°C de la misma estación ( $p < 0,01$ ), así como de los valores de su grupo equivalente de invierno ( $p < 0,01$ ). En invierno (Fig. 66b) el grupo de 25°C presenta una relación inferior ( $p < 0,01$ ) a la del grupo de baja temperatura durante el día.

La aclimatación a 5°C induce un incremento importante ( $\times 3,22$ ) de la relación  $T_3/T_4$  plasmática (Tabla XXII), mientras que el momento del fotociclo diario en el que los animales fueron sacrificados no influye de manera significativa ( $p = 0,07$ ), aunque se observa un incremento nocturno significativo en el grupo de 5°C de verano como hemos podido apreciar (Fig. 66a). La estación del año (verano) también provoca un aumento de esta proporción ( $\times 2,54$ ) cuando se compara con el grupo basal (invierno, 25°C, mediodía).



**Figura 66.** Efecto crónico de la temperatura sobre la relación  $T_3/T_4$  plasmática en adultos de *R. perezi* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-10$ ). \*\*  $p < 0,01$  respecto al correspondiente grupo de invierno; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

**Tabla XXII.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre la relación  $T_3/T_4$  plasmática en *R. perezii*. Grupo de referencia: Invierno, 25°C, mediodía.

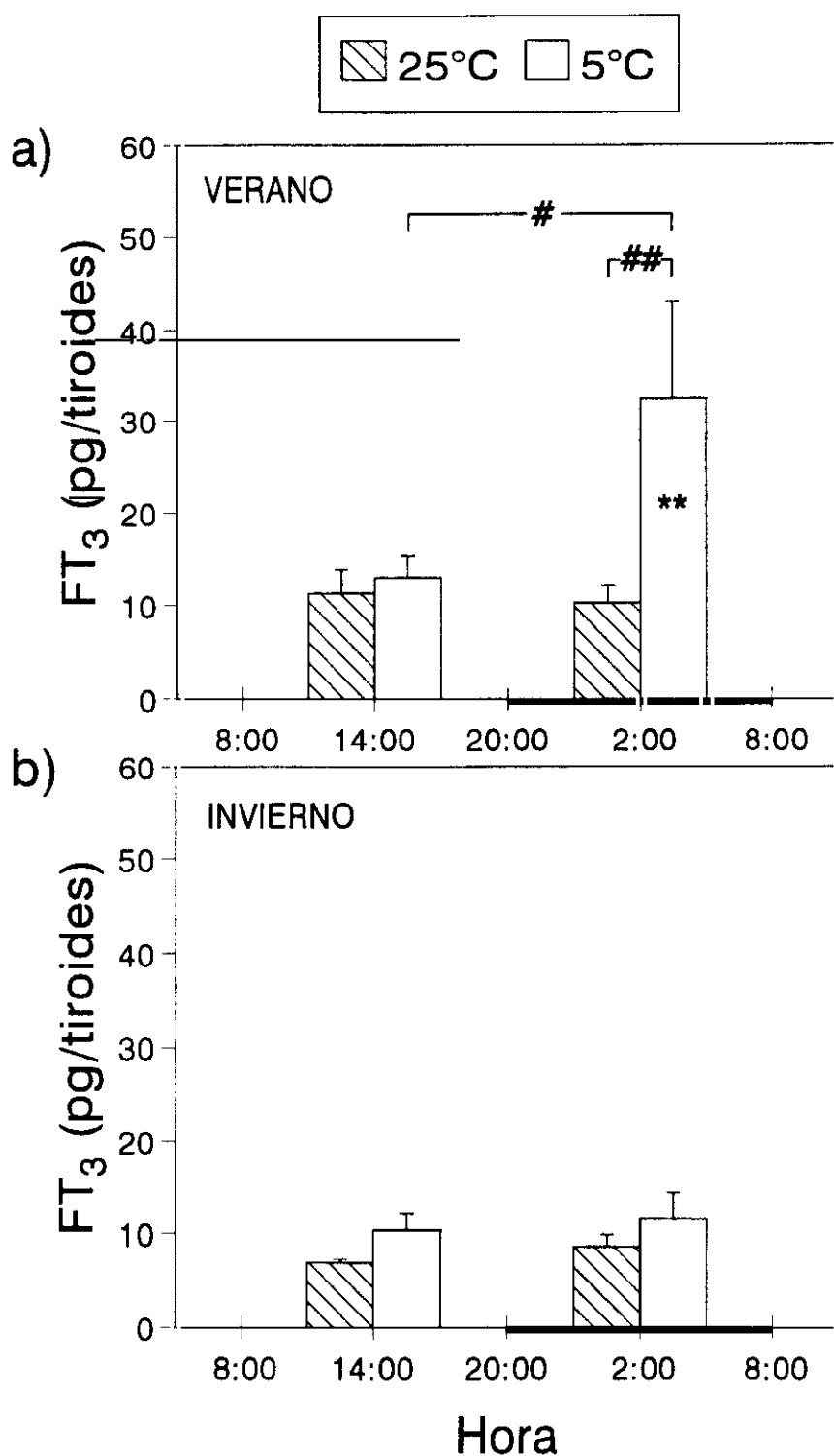
FACTOR	$\Delta T_3/T_4$
Verano	$\times 2,54$
5°C	$\times 3,22$
Medianoche	N.S.
<u>Interacciones</u>	N.S.
Intervalo de los residuos	$[-0,365 + 0,368]$

$\Delta T_3/T_4$  indica las veces que cada factor está incrementando la proporción con respecto al grupo de referencia.

El contenido de  $FT_3$  es similar en todos los grupos experimentales durante el invierno (Fig. 67b), mientras que en verano (Fig. 67a) el grupo aclimatado a 5°C y sacrificado durante la noche muestra los valores más altos, apareciendo diferencias significativas ( $p < 0,05$ ) respecto al correspondiente grupo diurno y respecto al grupo de 25°C nocturno ( $p < 0,01$ ), así como comparado con su homónimo de invierno ( $p < 0,01$ ).

En la Tabla XXIII podemos observar que tanto la estación del año (verano) como la temperatura de aclimatación (5°C) provocan un modesto incremento del contenido libre de  $T_3$  tiroidea. Sin embargo, no se observa una influencia significativa del fotociclo.

Los cambios en el contenido de  $FT_4$  (Fig. 68) en verano son paralelos a los de  $FT_3$ , sin embargo no hay diferencias significativas entre los grupos, mientras que en invierno se observan valores inferiores ( $p < 0,05$ ) en el grupo de 25°C, tanto al mediodía como a la medianoche (Fig. 68b), acompañados de un incremento de la relación  $FT_3/FT_4$  (Fig. 69b). Se detectan valores superiores de  $FT_4$ , durante el día ( $p < 0,05$ ) y durante la noche ( $p < 0,01$ ), en el grupo de temperatura alta de verano en comparación a los correspondientes de invierno, mientras que la proporción  $FT_3/FT_4$  muestra una relación inversa.



**Figura 67.** Efecto crónico de la temperatura sobre el contenido tiroideo de FT<sub>3</sub> en adultos de *R. perezii* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=7-10). \*\* p<0,01 respecto al correspondiente grupo de invierno; # p<0,05; ## p<0,01.

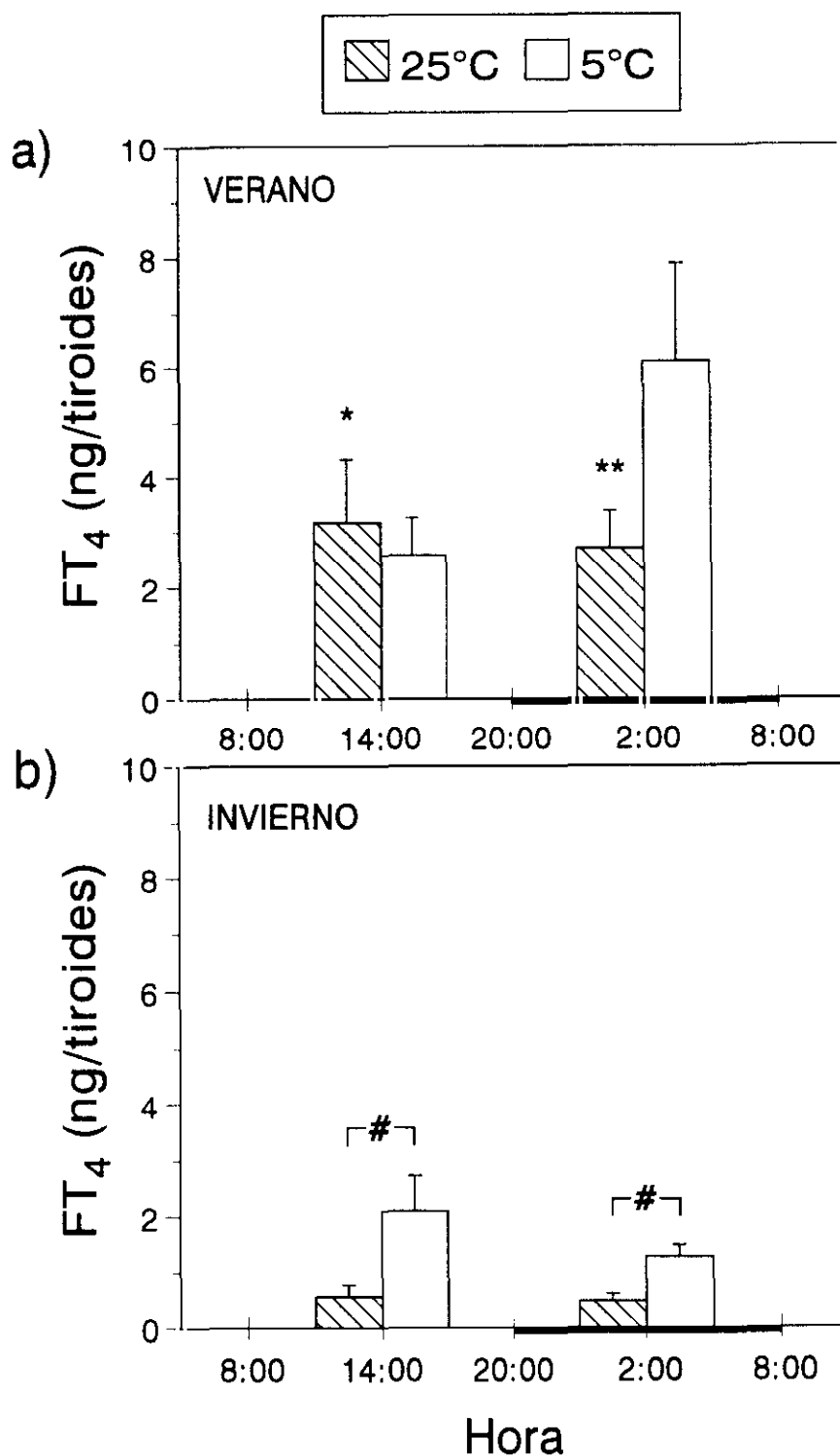
**Tabla XXIII.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre el contenido tiroideo de  $FT_3$  en *R. perezii*. Grupo de referencia: Invierno, 25°C, mediodía.

FACTOR	$\Delta FT_3$
Verano	$\times 1,44$
5°C	$\times 1,46$
Medianoche	N.S.
<u>Interacciones</u>	N.S.
Intervalo de los residuos	[-0,454 +0,619]

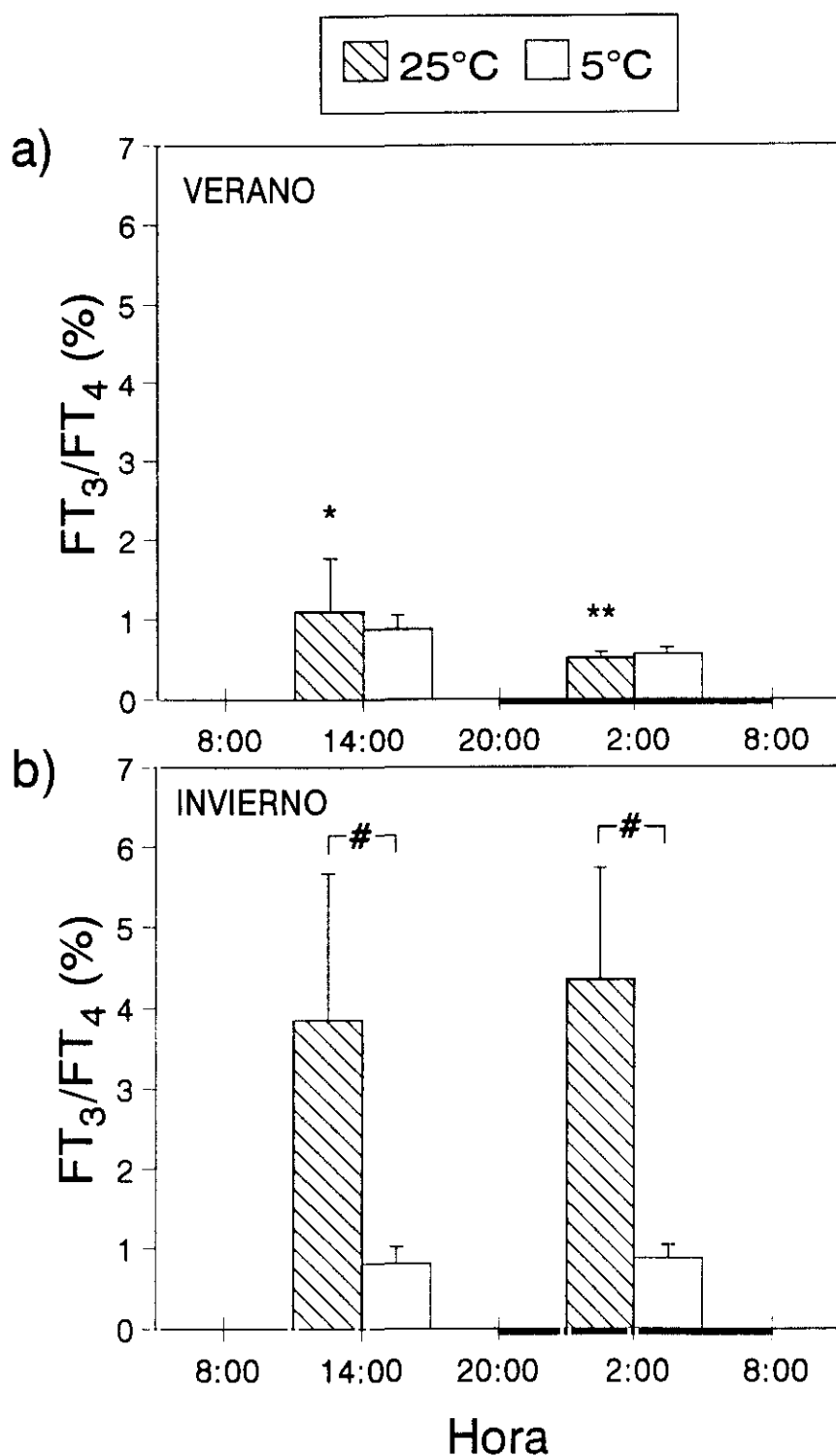
$\Delta FT_3$  indica las veces que cada factor está incrementando el contenido tiroideo de  $T_3$  libre con respecto al grupo de referencia o basal.

En cuanto a la potencia relativa de cada uno de los factores sobre el contenido tiroideo de  $FT_4$  (Tabla XXIV) y de la relación  $FT_3/FT_4$  (Tabla XXV), encontramos que cuando el experimento se realiza en verano se produce el incremento del contenido tiroideo de  $FT_4$  más importante ( $\times 3,17$ ), observándose también un efecto significativo ( $\times 2,46$ ) de la temperatura de aclimatación (5°C). En el caso de la relación  $FT_3/FT_4$  es el invierno la estación del año que induce un aumento ( $\times 2,03$ ) de esta relación, mientras que la aclimatación a 5°C provoca un descenso de la misma ( $\div 1,59$ ), que además se potencia por la aparición de interacciones significativas, de manera que cuando la aclimatación a 5°C se realiza en invierno se produce un descenso más acusado de la proporción  $FT_3/FT_4$  ( $\div 3,51$ ). Una vez más el fotociclo no influye de manera significativa sobre ninguno de los dos parámetros.

Con respecto al contenido de  $BT_3$  (Fig. 70), no se observan diferencias significativas ni en verano ni en invierno. Tampoco se observan diferencias entre las dos estaciones. El contenido de  $BT_4$ , sin embargo, sí presenta variaciones (Fig. 71). Así, en verano el grupo aclimatado a baja temperatura exhibe un menor contenido de  $BT_4$  cuando se compara con el grupo de 25°C diurno ( $p < 0,05$ ) y con el de 5°C nocturno ( $p < 0,01$ ). En invierno (Fig. 71b) sólo hay diferencias significativas entre las dos temperaturas de aclimatación a la



**Figura 68.** Efecto crónico de la temperatura sobre el contenido tiroideo de FT<sub>4</sub> en adultos de *R. perezii* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=7-10). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto al correspondiente grupo de invierno; #  $p < 0,05$ .



**Figura 69.** Efecto crónico de la temperatura sobre el la proporción  $FT_3/FT_4$  tiroidea en adultos de *R. perezi* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  (n=7-10). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$  respecto al correspondiente grupo de invierno; #  $p < 0,05$ .



**Tabla XXIV.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre el contenido tiroideo de  $FT_4$  en *R. perezii*. Grupo de referencia: Invierno, 25°C, mediodía.

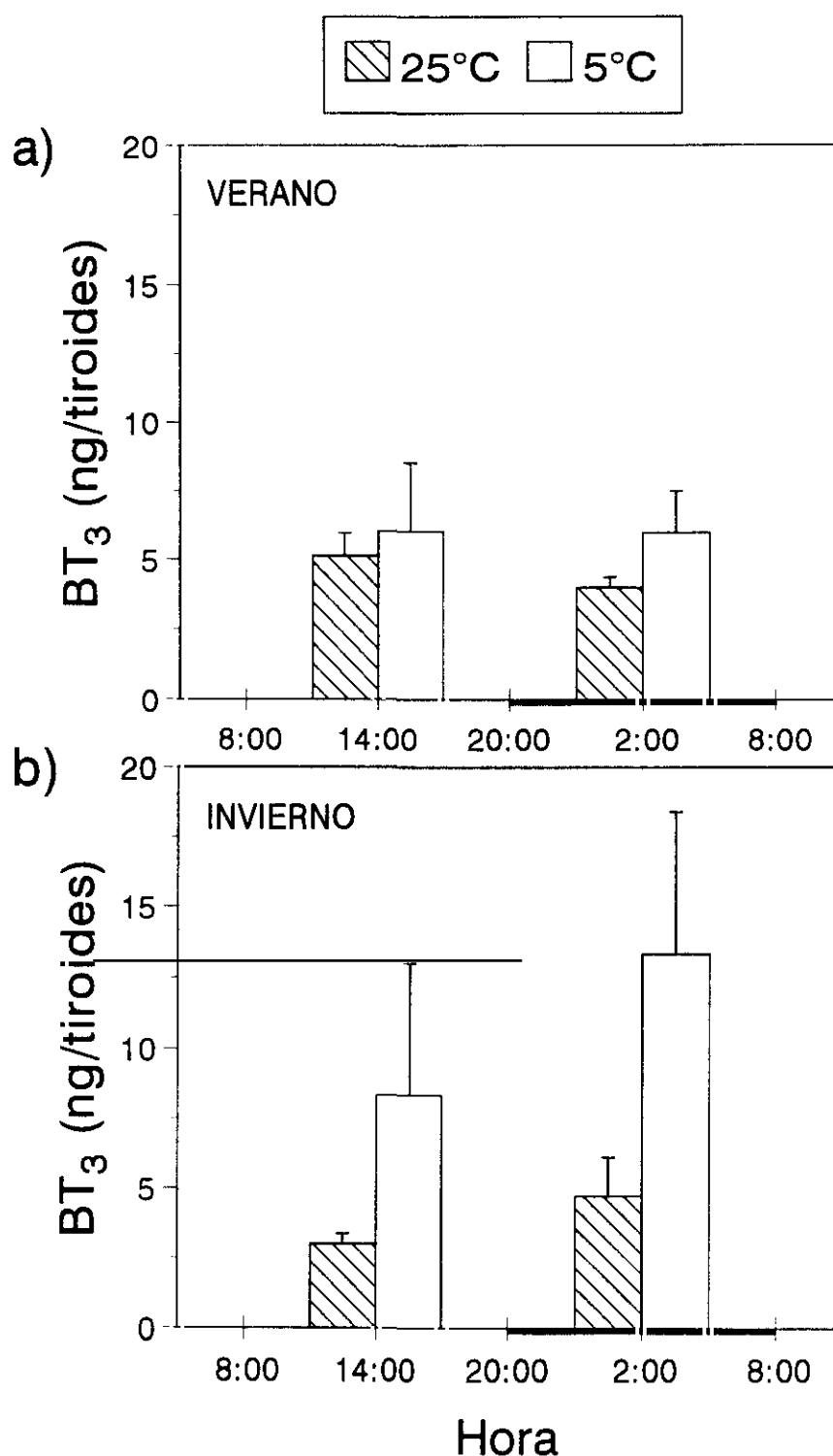
FACTOR	$\Delta FT_4$
Verano	$\times 3,17$
5°C	$\times 2,46$
Medianoche	N.S.
<u>Interacciones</u>	N.S.
Intervalo de los residuos	[-0,512 +0,343]

$\Delta FT_4$  indica las veces que cada factor está incrementando el contenido tiroideo de  $T_4$  libre con respecto al grupo de referencia o basal.

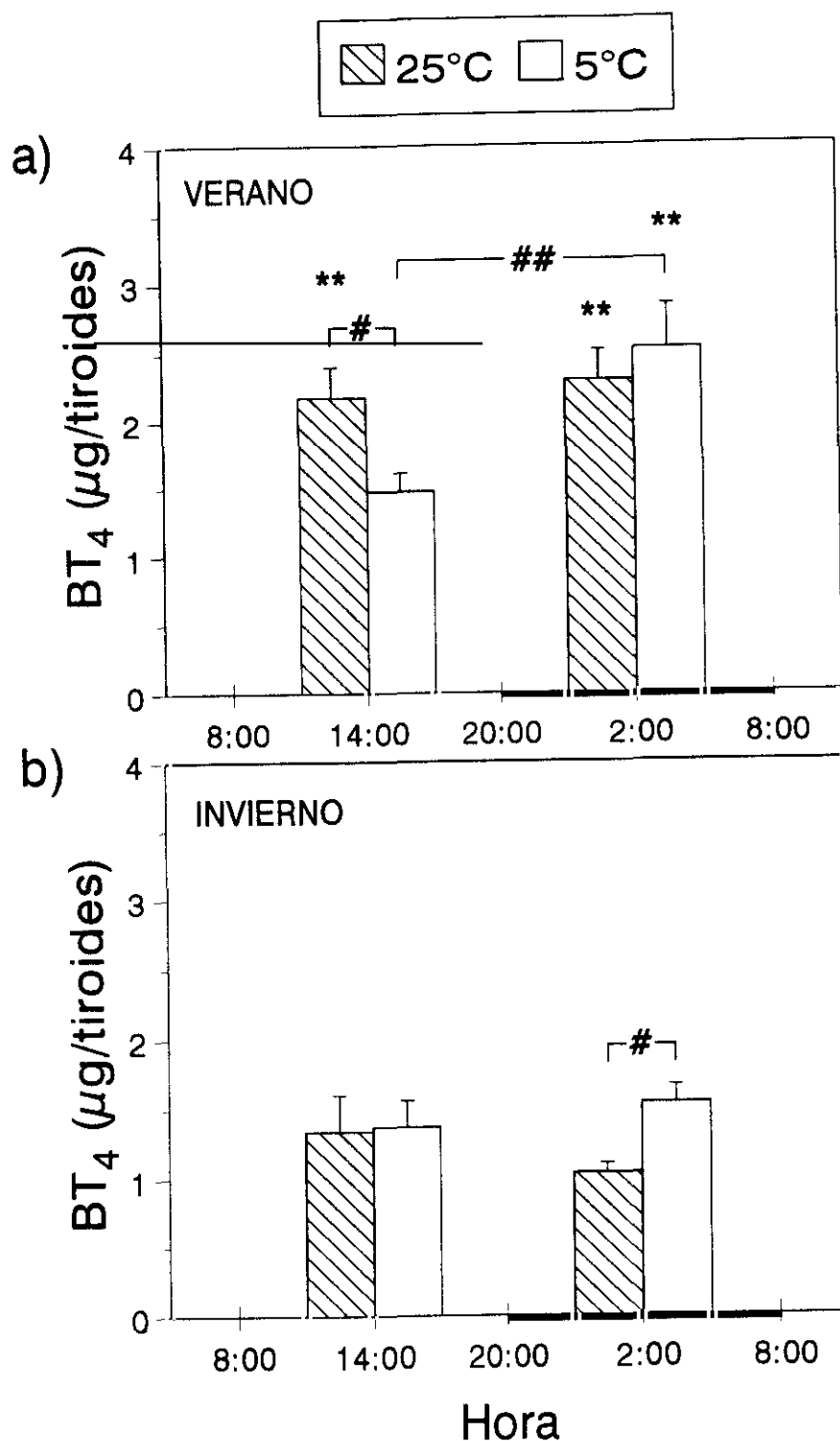
**Tabla XXV.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre la relación  $FT_3/FT_4$  tiroidea en *R. perezii*. Grupo de referencia: Verano, 25°C, medianoche.

FACTOR	$\Delta FT_3/FT_4$
Invierno	$\times 2,03$
5°C	$\div 1,59$
Mediodía	N.S.
<u>Interacciones</u> Invierno y 5°C	$\div 3,51$
Intervalo de los residuos	[-0,226 +0,201]

$\Delta FT_3/FT_4$  indica las veces que cada factor está incrementando o disminuyendo la proporción con respecto al grupo de referencia.



**Figura 70.** Efecto crónico de la temperatura sobre el contenido tiroideo de  $BT_3$  en adultos de *R. perezi* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-10$ ).



**Figura 71.** Efecto crónico de la temperatura sobre el contenido tiroideo de  $BT_4$  en adultos de *R. perezii* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-10$ ). \*\*  $p < 0,01$  respecto al correspondiente grupo de invierno; #  $p < 0,05$ ; ##  $p < 0,01$ .

medianoche, siendo superior ( $p < 0,05$ ) el contenido de  $BT_4$  en el grupo de  $5^\circ\text{C}$ . Los valores de verano, con excepción del grupo de baja temperatura diurno, son superiores ( $p < 0,01$ ) a los correspondientes de invierno.

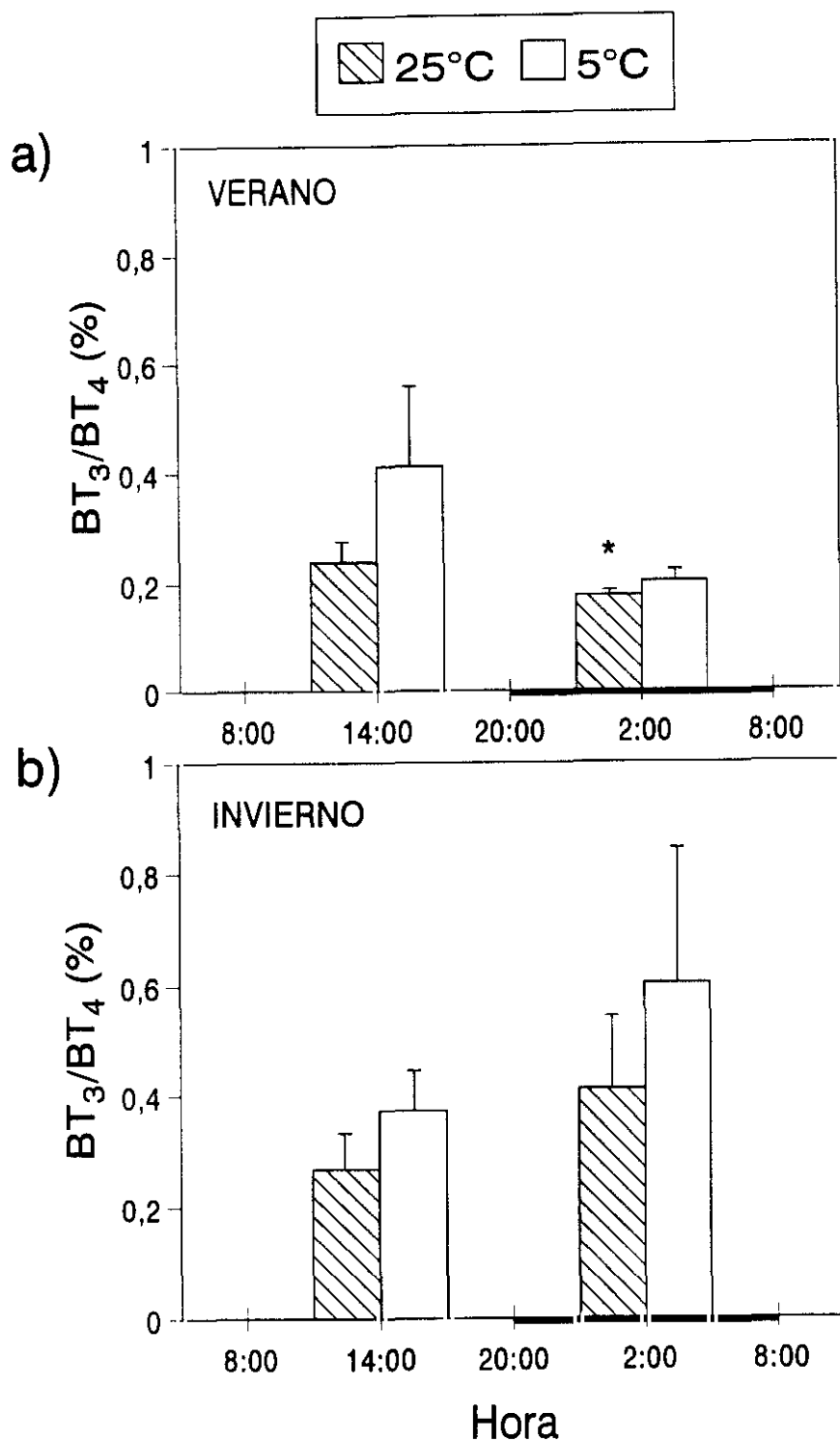
En la Tabla XXVI podemos apreciar que cuando el experimento se realiza en verano se produce un aumento del contenido tiroideo de  $BT_4$  de 1,6 veces, lo que concuerda con lo que acabamos de describir, y mientras que la temperatura de aclimatación y el fotociclo no tienen un efecto significativo *per se*, se observa un descenso de 1,5 veces debido a la interacción existente cuando se realiza la aclimatación a  $5^\circ\text{C}$  durante el verano y un descenso adicional ( $\div 1,42$ ) cuando los animales aclimatados a  $5^\circ\text{C}$  se sacrifican al mediodía, razones por las que observábamos diferencias entre las dos temperaturas de aclimatación y diferencias día/noche en el contenido tiroideo de  $BT_4$  (Fig. 71).

**Tabla XXVI.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre el contenido tiroideo de  $BT_4$  en *R. perezii*. Grupo de referencia: Invierno,  $25^\circ\text{C}$ , medianoche.

FACTOR	$\Delta BT_4$
Verano	$\times 1,59$
$5^\circ\text{C}$	N.S.
Mediodía	N.S.
<u>Interacciones</u>	
Verano y $5^\circ\text{C}$	$\div 1,46$
Mediodía y $5^\circ\text{C}$	$\div 1,42$
Intervalo de los residuos	$[-0,448 + 0,581]$

$\Delta BT_4$  indica las veces que cada factor está incrementando o disminuyendo el contenido tiroideo de  $T_4$  unida con respecto al grupo de referencia o basal.

Por último, la proporción  $BT_3/BT_4$  no presenta cambios en ninguna de las dos estaciones anuales (Fig. 72) y sólo se aprecia que el grupo nocturno de  $25^\circ\text{C}$  de verano



**Figura 72.** Efecto crónico de la temperatura sobre la proporción  $BT_3/BT_4$  tiroidea en adultos de *R. perezii* en a) verano e b) invierno. Los animales se aclimataron a las condiciones experimentales durante 40 días en cada estación y se sacrificaron al mediodía y a la medianoche. La barra negra representa la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D). Los datos representan la  $\bar{x} \pm e.e.m.$  ( $n=7-10$ ). \*  $p < 0,05$  respecto al correspondiente grupo de invierno.

presenta valores inferiores ( $p < 0,05$ ) a los del mismo grupo en invierno. En este sentido, el análisis de la potencia relativa de los distintos efectos principales que afectan a la relación  $BT_3/BT_4$  (Tabla XXVII) indica que efectivamente cuando el experimento se realiza en invierno se produce un pequeño incremento ( $\times 1,51$ ) de la citada proporción.

**Tabla XXVII.** Potencia de los efectos principales que influyen sobre la relación  $BT_3/BT_4$  tiroidea en *R. perezii*. Grupo de referencia: Verano, 25°C, medianoche.

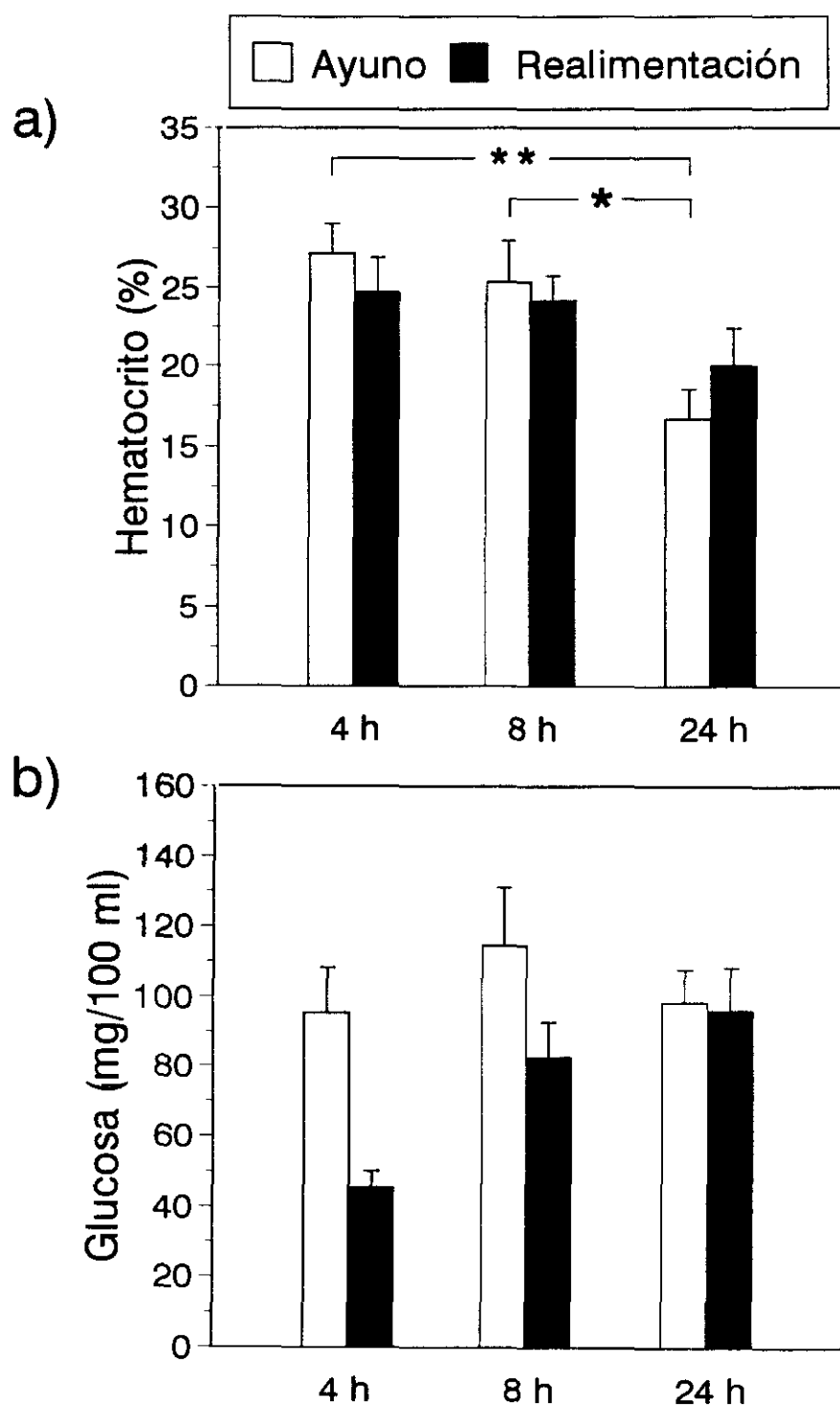
FACTOR	$\Delta BT_3/BT_4$
Invierno	$\times 1,51$
5°C	N.S.
Mediodía	N.S.
<u>Interacciones</u>	N.S.
Intervalo de los residuos	[-0,502 +0,484]

$\Delta BT_3/BT_4$  indica las veces que cada factor está incrementando o disminuyendo la proporción con respecto al grupo de referencia.

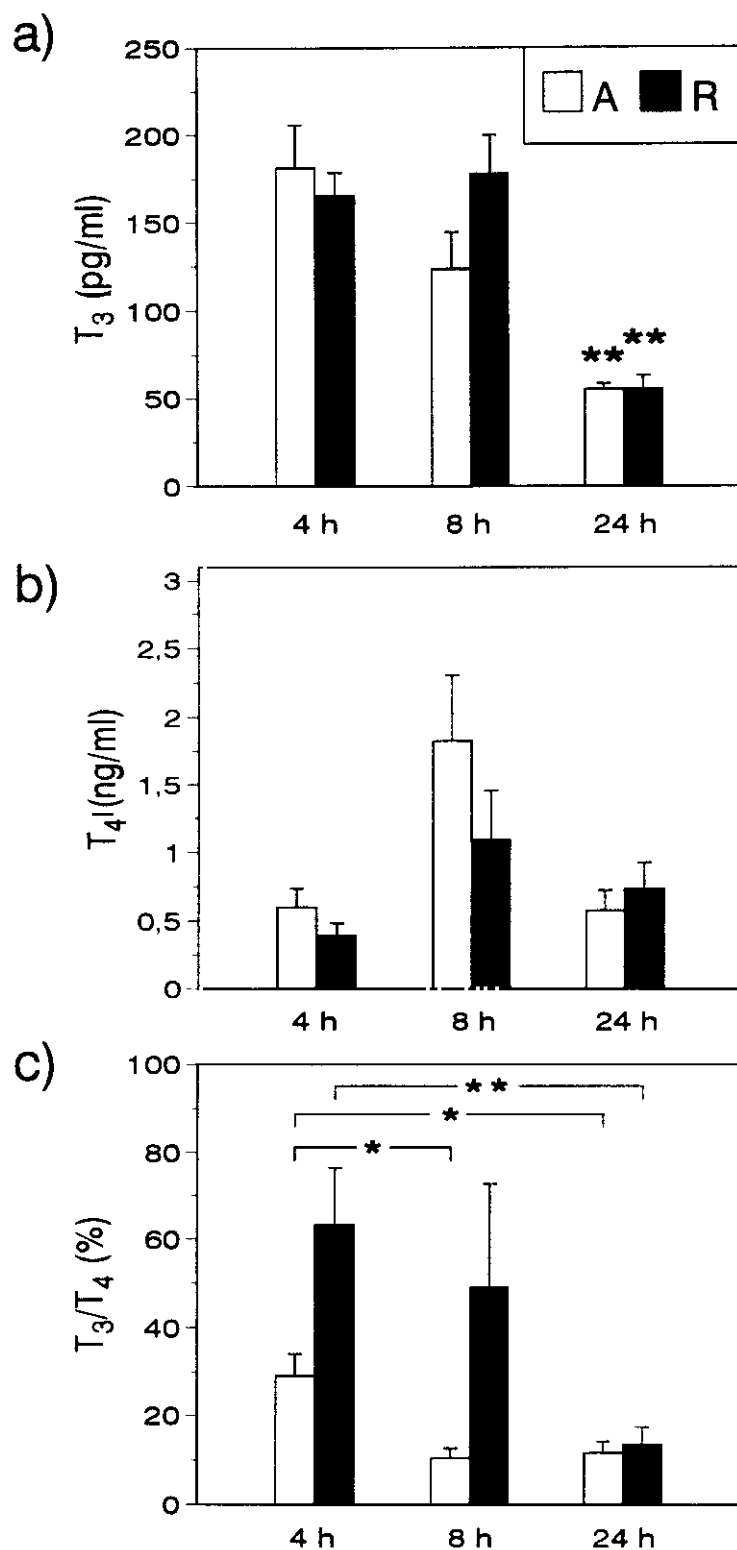
### 5.2.3. ALIMENTACIÓN.

En la Fig. 73 se han representado los valores de glucosa en plasma y el hematocrito a las distintas horas en las que se efectuó la extracción de sangre (véase Materiales y Métodos, 2.8.5.2.c). El hematocrito disminuye a las 24 horas (3ª extracción) en el grupo control que no había recibido comida tras el período de ayuno (Fig. 73a), por lo que los valores de los distintos parámetros plasmáticos fueron corregidos teniendo en cuenta el correspondiente hematocrito. En la Fig. 73b se puede apreciar la falta de alteraciones en los niveles de glucosa plasmática.

El efecto de una única comida tras una semana de ayuno sobre los valores plasmáticos de HT se presenta en la Fig. 74, donde podemos observar que no existen diferencias significativas entre los niveles de  $T_3$  de los dos grupos experimentales a ninguno de los tiempos estudiados a partir de la alimentación (Fig. 74a). Sin embargo, sí se aprecia un

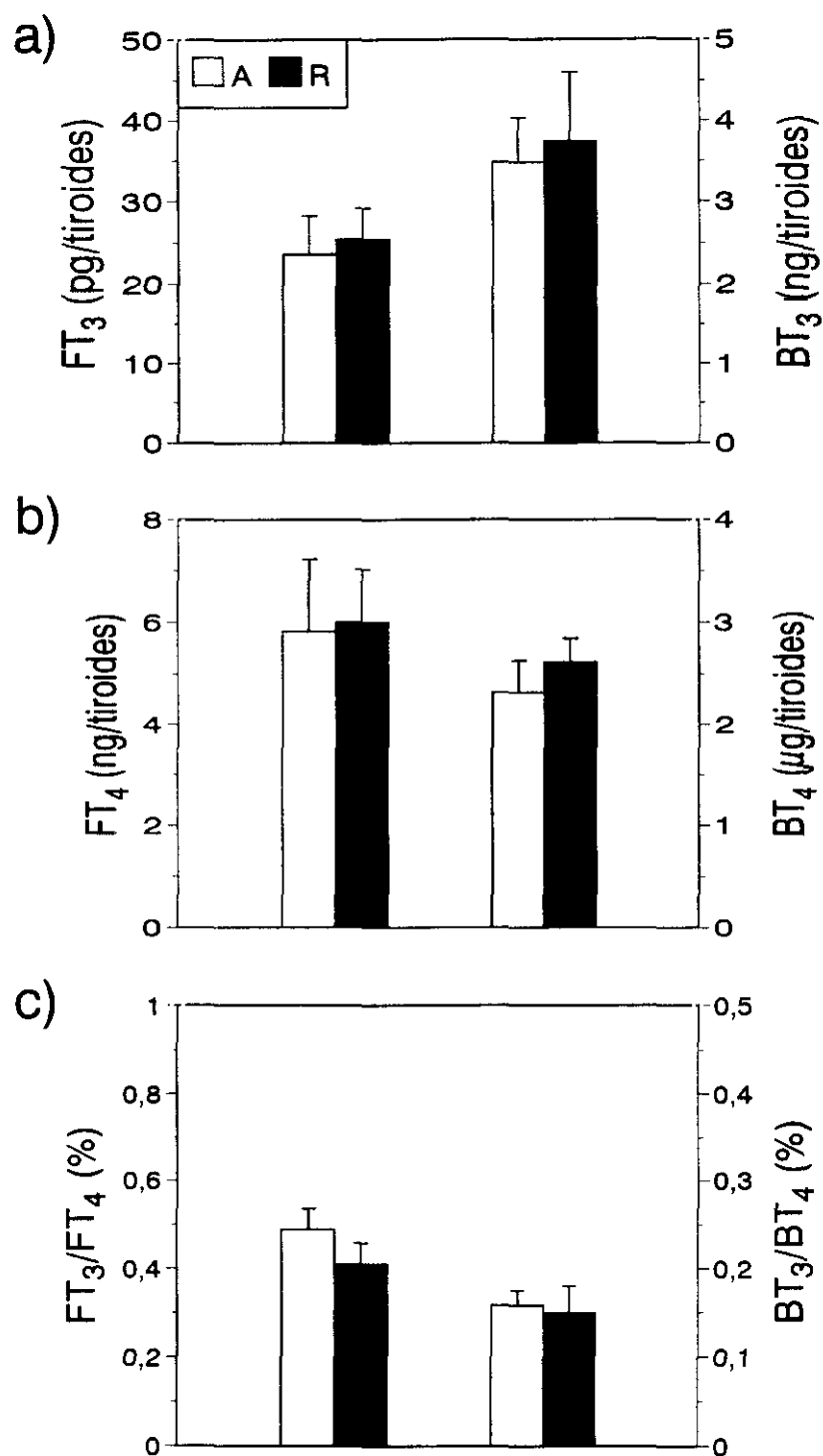


**Figura 73.** a) Hematocrito y b) niveles plasmáticos de glucosa en hembras de *R. perezii* a las 4, 8 y 24 h de la realimentación (R) tras una semana de ayuno (A). Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  ( $n=12$ ). \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ .



**Figura 74.** Niveles plasmáticos de a) T<sub>3</sub> y b) T<sub>4</sub> y c) relación T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> plasmática en hembras de *R. perezii* a las 4, 8 y 24 h de la realimentación tras una semana de ayuno. Los datos representan la  $\bar{x} \pm \text{e.e.m.}$  (n=12). Significación estadística: a) \*\* p < 0,01 respecto a los correspondientes grupos a las 4 y 8 h; c) \* p < 0,05; \*\* p < 0,01.





**Figura 75.** Contenidos tiroideos de a) FT<sub>3</sub> y BT<sub>3</sub>, b) FT<sub>4</sub> y BT<sub>4</sub> y c) relaciones FT<sub>3</sub>/FT<sub>4</sub> y BT<sub>3</sub>/BT<sub>4</sub> tiroideas en hembras de *R. perezi* a las 24 h de la realimentación tras una semana de ayuno. Los datos representan la  $\bar{x} \pm$  e.e.m. (n=12).

descenso ( $p < 0,01$ ) de los niveles a las 24 horas en cada uno de los grupos con respecto a los niveles del mismo grupo a las 4 y 8 horas. Los niveles plasmáticos de  $T_4$  no presentan diferencias significativas en ningún caso (Fig. 74b). Por otra parte, se observa que la administración de una única comida tiende a incrementar la relación  $T_3/T_4$  (Fig. 74c) a las 4 y 8 horas, aunque no llega a ser estadísticamente significativo, y desciende a las 24 horas ( $p < 0,01$ ), mientras que en el grupo control el descenso se produce ya a las 8 horas ( $p < 0,05$ ).

En cuanto al contenido de HT, fracciones libre y unida, a las 24 horas de la alimentación, así como sus respectivas relaciones, no presentan cambios significativos entre los dos grupos (Fig. 75).

## **V. DISCUSIÓN**

## 1. HORMONAS TIROIDEAS EN LA ONTOGENIA DE *R. perezii*: CICLOS DIARIOS.

Nuestros resultados indican que existen HT en embriones de *R. perezii* desde el momento de la eclosión (21-22 G). A pesar de que son bastantes los trabajos que se han realizado previamente analizando los cambios de HT, sobre todo plasmáticas, a lo largo del desarrollo de anfibios anuros, son muy pocas las especies que se han estudiado hasta el momento (*X. laevis*: Leloup y Buscaglia, 1977; *R. catesbeiana*: Regard *et al.*, 1978; Mondou y Kaltenbach, 1979; Suzuki y Suzuki, 1981; *R. esculenta*: Schultheiss, 1980; *R. clamitans*: Weil, 1986), y sólo recientemente se han evaluado los cambios en la concentración total de HT (ng/g tejido) a lo largo del desarrollo en *B. japonicus* (Niinuma *et al.*, 1991) y *B. marinus* (Weber *et al.*, 1994). Este último estudio, además, es el único que ha analizado también los cambios en el contenido total (ng/individuo) y el primero en determinar la presencia de HT en estados embrionarios (Weber *et al.*, 1994), es decir, antes de que el tejido tiroideo de las larvas se diferencie, aunque este hecho ya había sido sugerido previamente a partir de estudios morfológicos llevados a cabo en *B. japonicus* (Hanaoka *et al.*, 1973). La presencia de HT durante la embriogénesis se había constatado con anterioridad en mamíferos (Obregón *et al.*, 1984), aves (Prati *et al.*, 1992) y peces teleósteos (De Jesús y Hirano, 1992), sugiriéndose que estas HT son de origen materno, ya que además se ha observado su presencia en huevos de aves y peces (Prati *et al.*, 1992; Tagawa y Hirano, 1987), así como su acumulación durante la ovogénesis (Sechman y Bobek, 1988; Weber *et al.*, 1992). Una situación similar podría darse en anfibios, ya que en nuestro laboratorio se ha determinado una cantidad considerable de HT en gónadas de *R. perezii* ( $\approx 52$  pg de  $T_3$ /g de ovario; Domínguez *et al.*, datos sin publicar). Sin embargo, también ha sido sugerido que el tejido tiroideo de anuros puede ser capaz de producir cantidades limitadas de HT hacia la mitad de la embriogénesis (Hanaoka *et al.*, 1973), antes de que las reservas de HT presentes en el vitelo se consuman (Weber *et al.*, 1994).

Los datos obtenidos, en relación a la cantidad de HT detectada en estados embrionarios de *R. perezii*, difieren de los descritos en *B. marinus* (Weber *et al.*, 1994). En esta última especie se observaron un día después de la fecundación concentraciones de  $T_4$  equivalentes a las que nosotros encontramos hacia la eclosión, mientras que en este estado no fueron detectables en *B. marinus*, permaneciendo así hasta el inicio de la

premetamorfosis. En *R. perezii* también observamos un descenso de la concentración de  $T_4$  en el siguiente estado embrionario estudiado (25 G) y un aumento de la misma en larvas premetamórficas (I-II TK, 26-27 G). Las diferencias entre *B. marinus* y *R. perezii* en este período podrían deberse a que el límite de detección de nuestro ensayo es mucho menor que el del utilizado por Weber y colaboradores y por tanto, podría ocurrir que durante el período embrionario, en el que las concentraciones son muy bajas, estos autores estuvieran infravalorando la cantidad real de hormonas. Aunque no tenemos datos previos al momento de la eclosión en *R. perezii*, teniendo en cuenta el hecho anteriormente citado, es posible que en etapas anteriores hubieramos encontrado valores más elevados todavía. Sin embargo, también es perfectamente factible que las concentraciones de HT en estas dos especies sean diferentes, ya que de hecho el contenido total de  $T_4$  que nosotros encontramos al final del clímax es de  $\approx 0,6-0,75$  ng/ind. (día-noche) frente a los  $\approx 0,45$  ng/ind. observados en *B. marinus* (Weber *et al.*, 1994), supuestamente durante el día, puesto que en este trabajo no se especifica el horario de muestreo. Sin embargo, la concentración total de  $T_4$  en este mismo estado fue menor en *R. perezii* ( $\approx 1,5-2,5$  ng/g) que en *B. marinus* ( $\approx 5,5$  ng/g), debido a que el peso corporal de *R. perezii* (3,7-438,4 mg) es muy mayor que en *B. marinus* ( $< 3-171,3$  mg) a lo largo de todo el desarrollo. La concentración de  $T_4$ , así como el peso corporal, a lo largo de la ontogenia de *B. japonicus* (Niinuma *et al.*, 1991) son muy similares a los de *B. marinus*. Por tanto, parece que, efectivamente, los distintos valores observados en *R. perezii* y *Bufo* estarían reflejando diferencias filogenéticas. Por otra parte, tanto en *B. marinus* como en *B. japonicus*, las concentraciones de  $T_3$ , así como el contenido total en el caso de *B. marinus*, son mucho mayores que las encontradas en *R. perezii* y también superiores a los niveles plasmáticos de esta hormona en *R. catesbeiana* (Regard *et al.*, 1978; Suzuki y Suzuki, 1981). Asimismo, nosotros hemos observado recientemente en *Bufo calamita* valores de  $T_3$  (concentración y contenido total) superiores a los de *Rana* (Gancedo *et al.*, datos sin publicar). Si bien la comparación directa de los datos obtenidos en *Bufo* y *R. perezii* con los de *R. catesbeiana* no es posible en este momento (no se dispone de los valores plasmáticos de HT en *Bufo* y *R. perezii* ni de las concentraciones y/o contenidos totales en *R. catesbeiana*), parece interesante destacar que también en *X. laevis* (Leloup y Buscaglia, 1977; Gancedo *et al.*, 1994a) se han observado valores plasmáticos de  $T_3$  más elevados que en *R. catesbeiana* y *R. perezii*, siendo comparables a los de *Bufo*, sugiriendo que podría estar relacionado con el hecho de que estas especies (*Bufo* y *Xenopus*) presenten un clímax y preclímax más cortos, dada la generalmente aceptada mayor importancia de la  $T_3$  en la

metamorfosis.

En general la evolución del contenido de HT a lo largo del desarrollo de *R. perezi* es similar a la descrita previamente para otras especies (véase Introducción, 1.2.). De forma que el contenido total de HT aumenta según se acerca el clímax metamórfico y al final de este período (XXV TK) el contenido de  $T_3$  es mucho mayor que en prometamorfosis reforzando la hipótesis de que este aumento se debe fundamentalmente a un incremento en la desyodación periférica (véase Kühn *et al.*, 1993b), ya que la actividad 5'D aumenta hasta cinco veces durante el clímax (Galton y Hiebert, 1988). En *R. perezi* esta hipótesis se confirma con el incremento de la proporción  $T_3/T_4$  diurna observado en esta etapa del desarrollo. En cuanto a la evolución de esta proporción en la ontogenia, resulta interesante el aumento que se observa en el estado 25 G, supuestamente antes de que el tiroides sea funcional y de que la actividad 5'D aparezca. Una posibilidad es que estas hormonas de origen materno estén siendo utilizadas por la larva en desarrollo, de forma que tanto  $T_3$  como  $T_4$  disminuyen con respecto al estado anterior, sin embargo la  $T_4$  disminuye de forma mucho más acusada que la  $T_3$  lo que justifica el aumento de la correspondiente proporción. Esta diferencia entre la evolución de  $T_4$  y  $T_3$  podría explicarse por una degradación mayor de la  $T_4$ , habiéndose descrito la presencia de la actividad 5D, que desactiva la  $T_4$ , en larvas premetamórficas de *R. catesbeiana* (Galton y Hiebert, 1987b). Otra posibilidad a tener en cuenta es que el grado relativo de captación y utilización tisular de las HT puede variar a lo largo del desarrollo.

En prometamorfosis (XV-XVI TK, 40 G) la concentración de  $T_3$  y  $T_4$  durante el día no parece modificarse significativamente con respecto a los valores encontrados en premetamorfosis, debido al gran aumento de peso que se produce durante la prometamorfosis, de forma que el contenido total, sobre todo de  $T_4$ , incrementa muy significativamente. Por tanto, en el estudio de los cambios de HT a lo largo de la ontogenia, es interesante analizar tanto la concentración como el contenido total, ya que aunque la dirección de estos cambios es similar, en general la magnitud es muy diferente, siendo mayor en el caso del contenido total, pudiendo afectar en gran medida a los resultados en períodos críticos de cambio de peso del animal. Además, es necesario tener en cuenta la influencia que el contenido de agua de las larvas tiene sobre su peso corporal, así como sobre el balance hídrico de los distintos compartimentos, pudiendo afectar a las concentraciones de HT tanto en el caso de las concentraciones totales como en el caso de las valoraciones plasmáticas. No obstante, el descenso del contenido de agua que se produce hacia el clímax (Brown *et al.*,

1988) no parece ser la causa del incremento de HT descrito en todas las especies estudiadas, como lo demuestra el estudio realizado en *B. marinus* (Weber *et al.*, 1994) y el presente en *R. perezi*.

En cuanto a la evolución de los valores nocturnos, se observa fundamentalmente un descenso aparente de la concentración de  $T_4$  en prometamorfosis, que vendría determinado por el ya mencionado aumento de peso y por el aumento diurno del contenido total de  $T_4$  que se observan en este estado.

La existencia de variaciones circadianas de la actividad tiroidea ha sido extensivamente estudiada en vertebrados homeotermos (Rintamäki *et al.*, 1986; Ahlersová *et al.*, 1986; Decuypere y Kühn, 1988; Peschke *et al.*, 1989). Entre los poiquilotermos, se han realizado bastantes estudios en peces teleósteos (véase Brown, 1988; Leatherland *et al.*, 1992), sugiriéndose que los ritmos diarios de  $T_4$  pueden variar estacionalmente (Noeske y Spieler, 1983). En anfibios, son muy pocos los estudios realizados en este campo.

Nuestros resultados indican por primera vez la existencia de cambios diarios en las HT de larvas de anfibios anuros. Un estudio previo realizado por Weil (1986) describe niveles plasmáticos de  $T_4$  relativamente altos al inicio de la prometamorfosis (X-XII TK), seguidos de un descenso hacia el estado XV TK. Estos resultados se interpretaron como consecuencia de posibles ritmos diarios en la secreción tiroidea. Desafortunadamente en los numerosos estudios realizados sobre HT en la ontogenia de anfibios no se especifican el horario de sacrificio y obtención de muestras, e incluso ni siquiera el fotoperíodo bajo el que las larvas eran mantenidas. Nuestros datos demuestran un perfil diario muy similar para la concentración y el contenido total de HT, encontrándose únicamente algunas diferencias en el grado de significación estadística.

Cambios significativos tanto de la concentración como del contenido total de HT aparecen por primera vez en premetamorfosis (I-II TK, 26-27 G). Sin embargo, en estados embrionarios se observan cambios en la proporción  $T_3/T_4$  con un descenso de la misma durante la fase oscura del fotociclo diario. Esta diferencia probablemente se deba a cambios diarios en la utilización y/o degradación de HT, como ha sido sugerido previamente (Wright *et al.*, 1986).

Wright y colaboradores (1986) encontraron en larvas premetamórficas de *R. pipiens* que la metamorfosis inducida por  $T_4$  era más rápida cuando esta hormona se administraba

hacia el final de la fase oscura del fotociclo o durante la primera mitad de la fase luminosa del mismo, lo que indicaba la existencia de cambios circadianos en la sensibilidad de los tejidos diana de la  $T_4$ , y sugería una producción rítmica de la hormona endógena. Resultados similares han sido también descritos en *X. laevis* (Burns *et al.*, 1987). Nuestros datos confirman esta hipótesis, sin embargo, estos autores proponían que la acrofase debería ocurrir en el momento de la máxima respuesta a  $T_4$ , es decir, al principio de la fase luminosa o al final de la fase oscura (Wright *et al.* 1986), mientras que nosotros hemos encontrado contenidos de HT más elevados en la primera mitad de la fase oscura, siendo a medianoche significativamente superiores a los valores diurnos. La interpretación de estos resultados aparentemente contradictorios es que la administración de  $T_4$  en el momento en que los niveles endógenos son máximos probablemente no produzca un efecto mayor debido a una saturación de los receptores de HT con el sustrato endógeno. De modo que, teniendo en cuenta esta reflexión, nuestros datos explicarían mejor los resultados anteriormente citados (Wright *et al.*, 1986; Burns *et al.* 1987), y por tanto el mayor efecto de la  $T_4$  exógena aparece cuando los contenidos endógenos son menores, aunque no podemos descartar que los perfiles diarios de HT sean diferentes entre especies.

En prometamorfosis desaparecen las fluctuaciones de  $T_3$ , observándose una cierta inversión del perfil en el caso de la  $T_4$ , de forma que la concentración de  $T_4$  diurna se mantiene con respecto al estado anterior, pero los valores nocturnos disminuyen. Sin embargo, considerando el contenido total, la respuesta es justo la contraria, como hemos señalado previamente, luego la situación real sería que los valores nocturnos se mantienen mientras que los diurnos aumentan de manera muy acusada. Esta situación podría atribuirse al aumento en la producción de  $T_3$  en este estado, que parece ser mayor durante la noche ( $T_3/T_4$  mayor). Sin embargo, un aumento en la degradación nocturna de  $T_4$  puede ser más probable (no se observan incrementos paralelos de  $T_3$ ). La limitación en el número de larvas disponibles sólo nos permitió obtener un único punto de muestreo durante la fase luminosa del fotociclo, y teniendo en cuenta la tendencia general a mostrar niveles nocturnos más elevados durante el resto de los estados, podría cuestionarse que realmente se produzca esta inversión del patrón día/noche de  $T_4$ . No obstante, un perfil diario similar también se ha encontrado en larvas prometamórficas de *D. pictus* (Gancedo *et al.*, datos sin publicar) y de *X. laevis* (Gancedo *et al.*, 1994a), reforzando la fiabilidad de este cambio.

Al final del clímax metamórfico no se detectan fluctuaciones significativas ni en la concentración ni en el contenido total de HT, si bien los valores medios tienden a aumentar



durante la noche, y los cambios en la proporción  $T_3/T_4$ , que hasta ahora se habían mantenido aunque con perfiles diferentes, desaparecen.

## 2. HORMONAS TIROIDEAS EN ADULTOS DE *R. perezii*: CICLOS DIARIOS Y ESTACIONALES.

Los resultados presentados en esta Memoria demuestran la existencia de fluctuaciones diarias de la actividad tiroidea en individuos adultos de *R. perezii*. Además, nuestros datos indican que estos perfiles día/noche cambian dependiendo de la estación del año, de manera que las oscilaciones máximas se observan en primavera y desaparecen en invierno (Gancedo *et al.*, 1994b).

Un ciclo diario de los niveles plasmáticos de  $T_3$  con valores mínimos hacia la medianoche aparece en primavera, verano y otoño, mientras que sólo se detectan cambios día/noche significativos en la concentración plasmática de  $T_4$ , con un perfil similar al de la  $T_3$ , en primavera (desafortunadamente los niveles de  $T_4$  en plasma no se pudieron determinar en verano). La monodesyodación periférica, considerando la proporción  $T_3/T_4$  plasmática como un índice aproximado de la misma, no parece modificarse a lo largo del fotociclo diario en ninguna de las estaciones estudiadas. Niveles diurnos más elevados de  $T_4$  en plasma se han descrito también en *A. tigrinum* en primavera (Norris *et al.*, 1981). Nuestros resultados concuerdan parcialmente con el único estudio sobre cambios diarios de la actividad tiroidea realizado anteriormente en anuros (*R. ridibunda*; Kühn *et al.*, 1983). Estos autores tampoco encontraron variaciones en los niveles de  $T_4$  plasmática en otoño e invierno. Sin embargo, observaron ritmos circadianos de  $T_3$  en plasma, así como de la proporción  $T_3/T_4$ , con la acrofase después de la medianoche en las dos estaciones anteriormente citadas. Estas discrepancias entre *R. ridibunda* y *R. perezii* podrían deberse a diferencias específicas, ya que se ha sugerido que los ritmos diarios de HT pueden variar incluso entre poblaciones de una misma especie (Noeske y Spieler, 1983), y en este sentido, diferentes autores han descrito en la misma especie (*Salmo gairdneri*) niveles máximos de  $T_4$  tanto durante el día como durante la noche, dependiendo de los estudios (véase Brown, 1988).

El fotoperíodo y la temperatura son señales importantes en la determinación de las variaciones diarias de diversos parámetros fisiológicos (Underwood, 1988, 1990). En el experimento realizado por Kühn y colaboradores (1983) en Diciembre el fotoperíodo no era

el propio de la estación, sino que era un fotoperíodo largo (14L:10D, similar al fotoperíodo natural de primavera-verano), pudiendo explicar en parte las fluctuaciones diarias en el contenido plasmático y tiroideo de HT en *R. ridibunda* hibernante, en contraste con la total desaparición de ciclicidad tiroidea observada en invierno en *R. perezi*. Además, es interesante destacar que cuando individuos de *R. ridibunda* bajo un fotoperíodo 14L:10D en Diciembre fueron aclimatados a 20°C, se produjo un cambio en la acrofase del ciclo de  $T_3$  plasmática hacia el inicio del día (Kühn *et al.*, 1983). Nosotros hemos encontrado resultados similares en primavera, en condiciones ambientales de fotoperíodo y temperatura análogas a las descritas para *R. ridibunda*.

La comparación de los perfiles diarios de los niveles plasmáticos de  $T_3$  y  $T_4$  en las distintas estaciones pone de manifiesto lo que parece ser un cambio en el momento de la aparición de los niveles medios más altos, de forma que en primavera se observan en la primera mitad de la fase luminosa, mientras que en otoño aparecen al final de esta fase del fotociclo diario.

Nuestro trabajo constituye la primera aportación de cambios diarios en las HT determinadas en el tiroides como fracciones de  $T_3$  y  $T_4$  libres y unidas. La fracción libre representa la cantidad de hormona, procedente de la proteólisis de la Tg, preparada para ser liberada al torrente circulatorio (Haibach, 1971), mientras que la fracción unida representaría la hormona que ha sido sintetizada en el seno de la Tg y que permanece en el lumen folicular antes de ser internalizada y procesada por las células foliculares (Rousset, 1991). En nuestro estudio hemos observado oscilaciones día/noche significativas del contenido de  $BT_3$  y de  $BT_4$  en primavera y otoño. Además, los perfiles diarios del contenido de HT unidas son distintos en estas dos estaciones, corroborando los cambios estacionales en los patrones diarios de HT plasmáticas previamente mencionados. De este modo, el contenido de  $BT_3$  en primavera alcanza un máximo al principio de la fase oscura, mientras que en otoño se observa un desplazamiento de los valores altos hacia el final de la noche. De forma similar, el contenido de  $BT_4$  muestra un patrón bifásico en primavera, con valores altos al inicio, tanto de la fase de luz como de la fase oscura, y contenidos bajos hacia el final de la noche, momento en el que se observa un máximo en otoño. Aunque la temperatura es similar en primavera y otoño, los fotoperíodos son casi opuestos (13,5L:10,1D vs 10,5L:13,1D), y por tanto, parecería que el fotoperíodo es más importante que la temperatura en cuanto a la determinación del patrón día/noche de las fluctuaciones de la actividad tiroidea, como ha sido previamente sugerido para *R. ridibunda* (Kühn *et al.*, 1983). Sin embargo, en invierno, cuando el fotoperíodo es

similar al de otoño pero las temperaturas son más bajas, no se observan cambios diarios de HT, ni en plasma ni en tiroides. A primera vista estos resultados sugieren que mientras que el fotoperíodo podría estar regulando los perfiles diarios de actividad tiroidea en relación al momento del fotociclo diario en el que aparecen los valores máximos y mínimos, la temperatura podría ejercer un control sobre la magnitud de tales cambios, teniendo en cuenta que en general se observa una atenuación de los ciclos según descende la temperatura. No obstante, como veremos más adelante, parece más probable que se produzca una interacción de estos dos factores ambientales en el control de los cambios diarios de la actividad tiroidea.

Se ha descrito una ritmicidad circadiana del contenido tiroideo total de HT en *R. ridibunda* en Octubre, pero no en Septiembre (Kühn *et al.*, 1983), apareciendo la acrofase de  $T_3$  al mediodía y la de  $T_4$  al principio de la noche. Nuestros resultados no concuerdan completamente con los del equipo del Prof. Kühn, aunque también encontramos contenidos altos de HT al principio de la fase oscura en otoño.

Sólo se observaron cambios diarios significativos en la  $FT_3$  en primavera con un incremento al principio de la fase oscura, mientras que la  $FT_4$  en otoño muestra un máximo al principio de la fotofase. Por otra parte, la proporción  $FT_3/FT_4$  experimenta fluctuaciones significativas en primavera, lo que podría estar reflejando cambios en la desyodación y/o degradación intratiroidea. A este respecto, se ha sugerido que la degradación intratiroidea debe ser alta durante el ciclo diario de actividad tiroidea, ya que resulta bastante improbable que la diferencia existente entre el contenido tiroideo máximo y el mínimo de HT se deba a procesos de secreción (Kühn *et al.*, 1983).

En primavera durante la fase luminosa parece producirse una secreción máxima, de forma que tanto la fracción libre como la unida disminuyen en el tiroides, mientras que los niveles plasmáticos permanecen relativamente estables. Por otra parte, las reservas tiroideas (libre y unida) de  $T_3$  se acumulan al inicio de la fase oscura y las de  $T_4$  también al inicio de la fase luminosa. Esto podría sugerir la existencia de fluctuaciones diarias en la producción de TSH, como se ha demostrado en mamíferos (Ortiz-Caro *et al.*, 1984; Weber *et al.*, 1991), y/o en la capacidad de respuesta del tiroides a dicha hormona hipofisaria. Además, los distintos patrones diarios de actividad tiroidea observados en primavera y otoño podrían estar relacionados con cambios estacionales en el perfil diario de TSH (Wong *et al.*, 1983). De hecho, en *A. tigrinum* se ha descrito que la máxima sensibilidad a la administración de TSH exógena aparece al final de la fase oscura en Octubre, pero no en Mayo. En cualquier caso,

la respuesta a esta interesante cuestión tendrá que esperar hasta que se desarrolle un RIA homólogo para TSH de anfibios.

Debemos considerar también la posible influencia de otros ciclos endocrinos diarios. En este sentido, se ha demostrado la existencia de interacciones del eje adrenal con la función tiroidea en mamíferos y aves (Vriend, 1983b; Williamson y Davison, 1987), habiéndose descrito incluso un cambio de fase en la ritmicidad circadiana de los niveles plasmáticos de corticosterona en codornices hipotiroideas (Kovács y Péczely, 1983). También en los anfibios existen interacciones entre estos dos ejes endocrinos durante la metamorfosis (véase Kikuyama *et al.*, 1985, 1988; Dent, 1988; Rosenkilde y Ussing, 1990; Kikuyama, 1991). Se han descrito ritmos circadianos de corticosterona y aldosterona en anfibios adultos, con niveles generalmente más elevados durante la noche (Leboulenger *et al.*, 1982; Pancak y Taylor, 1983). Además, como veremos más adelante, el CRF es capaz de estimular tanto el eje tiroideo como el eje interrenal en larvas y adultos de anfibios (Denver, 1988, 1993; Denver y Licht, 1989; Jacobs y Kühn, 1989, 1992; Malagón *et al.*, 1991). Por otra parte, los niveles de HT circulantes influyen de manera importante en la regulación del eje adrenal modificando los niveles de ARNm de CRF hipotalámico (Shi *et al.*, 1994). De manera que existe la posibilidad de que las variaciones de la actividad tiroidea en anfibios estén determinadas, al menos en parte, por interacciones con el eje interrenal.

Con relación a las diferencias observadas en los cambios diarios en HT entre larvas y adultos de *R. perezi*, podría ocurrir que el patrón varíe tras la metamorfosis, ya que incluso durante la ontogenia hemos encontrado un cambio en prometamorfosis y la desaparición de oscilaciones al final del clímax, lo que podría estar anticipando la adaptación del sistema larvario a la situación del adulto. Por otra parte, hemos de considerar que en el caso de las larvas estamos valorando el conjunto total de yodotironinas extratiroideas mientras que en los adultos sólo tenemos los valores plasmáticos, de modo que podría ocurrir que los niveles de HT disminuyeran en el compartimento sanguíneo debido a un aumento de la captación tisular durante la noche. De hecho, los niveles circulantes de HT no siempre reflejan las concentraciones intracelulares de las mismas (Larsen *et al.*, 1981; Duellman y Trueb, 1986), de modo que podrían alterarse los niveles de T<sub>4</sub> en plasma sin modificarse los de T<sub>3</sub>, como consecuencia de un aumento de la unión a sus receptores intracelulares o de un incremento de la 5'D intracelular seguido de una elevación posterior en la degradación y/o excreción.

Además, si la MEL está implicada en la regulación de estos ciclos, debemos recordar que mientras que en larvas observamos un incremento de la  $T_4$  tras el tratamiento con MEL, en adultos el hipotético descenso de MEL circulante como consecuencia de la pinealectomía y la ceguera parece activar la síntesis y liberación de  $T_4$  durante el día. Por otra parte, como veremos más adelante, la naturaleza de las interacciones entre la actividad gonadal y la tiroidea también se modifica tras la metamorfosis.

La superposición de ciclos diarios y ciclos estacionales complica la interpretación de los resultados. En esta parte de la Memoria relativa a los ciclos diarios de HT detectamos diferencias estacionales en los valores medios diarios de los parámetros de actividad tiroidea estudiados, que se vieron confirmadas en el estudio anual más detallado que se realizó posteriormente y que discutiremos a continuación.

En esta parte de la Memoria se muestran los perfiles estacionales de los niveles plasmáticos y el contenido tiroideo de  $T_3$  y  $T_4$  en machos y hembras de *R. perezi*, demostrándose la existencia de cambios importantes en diferentes parámetros de la actividad tiroidea a lo largo del ciclo anual y dependientes del sexo (Gancedo *et al.*, 1994c).

Los niveles de  $T_3$  en plasma tienden a aumentar desde Enero en adelante, alcanzando un máximo en Julio, seguido de un pronunciado descenso en Agosto-Octubre y una ligera recuperación de los niveles en Noviembre hasta alcanzar valores similares a los observados en Enero. Estos resultados concuerdan en parte con los obtenidos en la carpa (*Cyprinus carpio*; Stryjek-Kaminska *et al.*, 1988) donde también se observaron valores más elevados de  $T_3$  plasmática durante el verano con una caída en otoño seguido de un aumento progresivo de Enero a Junio. A pesar de que es generalmente aceptado que la  $T_3$  es la principal hormona biológicamente activa, existen muy pocos trabajos que describan los cambios anuales de  $T_3$  plasmática y tiroidea en anfibios adultos. Kühn y colaboradores (1985a) encontraron que la concentración plasmática de  $T_3$  no experimenta grandes cambios en machos de *R. ridibunda* en el período comprendido entre Diciembre y Agosto, con la excepción de un descenso en Diciembre y Marzo, aunque los animales en hibernación mantienen los niveles plasmáticos de  $T_3$  (Kühn *et al.*, 1983). Por el contrario, se ha descrito la existencia de un máximo de  $T_3$  plasmática durante los meses de Febrero-Marzo en machos y hembras de *B. japonicus* (Tasaki *et al.*, 1986). Las relativas discrepancias entre el presente estudio y los trabajos anteriormente citados podrían deberse a diferencias específicas, si bien *R. perezi* y *R.*

*ridibunda* son especies estrechamente relacionadas. Por otra parte, los niveles plasmáticos de HT medidos en anfibios adultos varían enormemente (véase Stieff y Kaltenbach, 1986), y en este sentido, *R. perezi* presenta a lo largo del año valores de  $T_3$  plasmática mucho más altos (12-75 pg/ml) que *R. ridibunda* (10-15 pg/ml) o *B. japonicus* (25 pg/ml). Además, en este último estudio los niveles de  $T_3$  estaban por debajo del límite de detección del ensayo (6 pg/ml) durante la mayor parte del año y sólo fue detectable en más del 50% de los individuos en Febrero- Marzo. Además, la existencia de cambios diarios de actividad tiroidea en anfibios, que ya hemos analizado en el apartado anterior, podría explicar en parte las diferencias observadas entre los tres estudios, ya que la toma de muestras de sangre se realizó en distintos momentos del fotociclo diario en cada uno de ellos, y en el caso de *B. japonicus* el horario de muestreo fue diferente dependiendo de la estación del año. Por último, tampoco podemos descartar la influencia de cambios en las condiciones ambientales de un año a otro y entre diferentes regiones.

Con respecto a la  $T_4$  plasmática, también hemos observado niveles altos durante la primavera y el verano, y niveles mínimos en Octubre en machos y hembras de *R. perezi*. Resultados similares se han descrito en *B. viridis* (Rosenkilde y Jorgensen, 1977) y *B. regularis* (Saad y Ali, 1992), donde la  $T_4$  plasmática alcanza los valores más altos en primavera-verano, produciéndose un descenso de los niveles en Octubre. Además, en *B. regularis* se observa un descenso significativo de la  $T_4$  plasmática en Abril y un aumento en Noviembre (Saad y Ali, 1992), al igual que ocurre en machos de *R. perezi*. Por otra parte, la concentración plasmática de  $T_4$  en machos de *R. ridibunda* mostró un máximo en Marzo (Kühn *et al.*, 1985a), aunque también se ha descrito en esta especie un descenso de los niveles de  $T_4$  de Febrero a Abril seguido de un segundo pico en Mayo (Vandorpe *et al.*, 1987). De forma similar, en machos y hembras de *B. japonicus* (Tasaki *et al.*, 1986) aparecen un pico principal en Marzo y uno secundario en Junio seguido de niveles mínimos en otoño.

Nuestro trabajo es el primero que analiza los cambios estacionales del contenido tiroideo de HT en anfibios valorando independientemente las fracciones libre y unida. Hemos encontrado que las fracciones libre y unida, tanto de  $T_3$  como de  $T_4$ , muestran valores elevados al principio de la primavera y durante el verano en hembras de *R. perezi*, mientras que los machos presentan principalmente un máximo en verano. De modo que estos datos concuerdan básicamente con los altos niveles plasmáticos de HT observados en estas dos estaciones, y además, están en línea con los escasos trabajos realizados con anterioridad

relacionados con la evolución estacional del contenido tiroideo total de HT en anfibios adultos. Así, en machos hibernantes de *R. ridibunda* se observó un contenido tiroideo de  $T_3$  y  $T_4$  bajo, que aumentaba en Abril-Mayo hasta alcanzar un máximo en Julio-Agosto (Kühn *et al.*, 1985a). Resultados similares se han descrito en hembras de *Dicroglossus occipitalis*, con contenidos tiroideos de HT máximos en Julio-Agosto y mínimos en Noviembre y Enero-Febrero (Kühn *et al.*, 1987b).

La obtención de conclusiones firmes acerca de las relaciones existentes entre los distintos indicadores de la actividad tiroidea estudiados es un poco arriesgada con los datos disponibles, y en este sentido la determinación de la actividad  $5'D$ , la  $rT_3$  o el "turnover" de HT, la peroxidasa tiroidea y la concentración de TSH serían de bastante ayuda en la interpretación de los resultados. Sin embargo, se pueden hacer algunas observaciones, que aun siendo en cierta medida especulativas, resultan interesantes. Así, parece que el patrón de secreción de la glándula cambia dependiendo de la estación, como se ha sugerido previamente (Kühn *et al.*, 1985a), y del sexo. Es decir, en Marzo se produce posiblemente una síntesis ( $BT_3/BT_4$  elevada) y liberación ( $FT_3/FT_4$  elevada) preferente de  $T_3$  y/o un aumento en la desyodación intratiroidea, reduciéndose la cantidad de  $FT_3$  que se acumula en la glándula y que pasaría a la circulación (niveles plasmáticos elevados). Un fenómeno similar se ha descrito con anterioridad en mamíferos (Peeters *et al.*, 1992). Además, en esta época del año se detecta en las hembras un aumento hipotético de la desyodación periférica ( $T_3/T_4$  plasmática elevada), con la consiguiente disminución de los niveles plasmáticos de  $T_4$ . En Abril la síntesis y secreción de HT en hembras es lo suficientemente alta como para permitir un aumento en los niveles plasmáticos junto con una acumulación de las reservas tiroideas. Por el contrario, en machos apenas se observa acumulación tiroidea y aparecen niveles inferiores de  $T_4$  en plasma, sugiriendo un grado de síntesis y secreción menor, apoyado por la existencia de una correlación positiva significativa entre la  $T_4$  plasmática y la  $FT_4$ , aunque no podemos descartar la posibilidad de que se produzca un aumento en la degradación y/o en la captación tisular. En Mayo se observan niveles plasmáticos de HT elevados, a expensas de su acumulación en la glándula. Una situación similar a la descrita en Abril aparece en Julio. Además, en hembras parece producirse una secreción máxima en contraste con Agosto, cuando la secreción parece no ser favorecida, de manera que las hormonas libres se acumulan, y posiblemente son sometidas a una posterior degradación intratiroidea, mientras que los niveles plasmáticos disminuyen abruptamente. De hecho,

existe una correlación negativa significativa entre la  $T_3$  plasmática y la  $FT_3$  en hembras. Finalmente, se observa un descenso de la actividad tiroidea en Octubre, seguido de una recuperación parcial en Noviembre. Las principales diferencias sexuales aparecen durante los meses más calurosos (Mayo-Agosto). En este sentido, se han descrito variaciones en la función tiroidea entre machos y hembras de *R. temporaria* tras la exposición a temperaturas altas (Ceusters *et al.*, 1978).

La proporción  $T_3/T_4$  plasmática es mucho más elevada que las proporciones tiroideas (libre y unida), indicando que la mayoría de la  $T_3$  plasmática procede de la monodesyodación periférica en *R. perezi*, como ya se ha sugerido en otros anfibios (Leloup *et al.*, 1981; Kühn *et al.*, 1985a). No obstante, la contribución tiroidea parece ser de relativa importancia en las fluctuaciones estacionales, como hemos discutido anteriormente. Por otra parte, la proporción  $FT_3/FT_4$  también es mucho mayor que la proporción  $BT_3/BT_4$ , apoyando la bien conocida preferencia general del tiroides por la producción de  $T_4$  y la liberación preferente de  $T_3$  y/o aumento de la desyodasa intratiroidea citada previamente.

Antes del final del período invernal hemos encontrado niveles plasmáticos de  $T_4$  relativamente altos en machos, y niveles altos de  $T_3$  en los dos sexos, lo que podría ser esencial para la reactivación del eje hipotálamo-hipofisis-tiroides (Kühn *et al.*, 1984b). Además, podría indicar que las HT desempeñan un papel en la regulación del metabolismo energético a bajas temperaturas, como ha sido sugerido con anterioridad en *B. japonicus* (Tasaki *et al.*, 1986). En lagartos, los lípidos de los cuerpos grasos parecen ser la principal fuente energética durante la hibernación, sugiriéndose un papel de las HT en la movilización de las grasas (Kar y Chandola-Saklani, 1985). Se ha descrito también una activación de las enzimas catabólicas hepáticas inducida por HT en peces teleósteos (Peter y Oomen, 1989). Además, se ha demostrado que las variaciones estacionales de algunas enzimas hepáticas en *R. temporaria* dependen de cambios en la actividad tiroidea (Wróbel *et al.*, 1992; Wróbel y Frendo, 1993). Durante la fase de hibernación el glucógeno hepático es la principal fuente de energía metabólica en anfibios (Byrne y White, 1975). En el presente estudio hemos observado cambios estacionales en el IHS que concuerdan con las variaciones cíclicas estacionales del glucógeno hepático en *R. esculenta* (Fenoglio *et al.*, 1992), sugiriendo que los cambios podrían deberse efectivamente a variaciones en el metabolismo energético y que las HT podrían estar implicadas en la movilización de estas reservas, aunque es necesario



tener en cuenta la participación de otras hormonas, como la insulina (Scapin e Incerpi, 1992). Por otra parte, nuestros resultados indican un descenso del IHS en la época previa a la reproducción y durante la misma, tanto en machos como en hembras, lo que está de acuerdo con estudios anteriores (Jolivet-Jaudet *et al.*, 1984), pudiendo estar relacionado con el aporte energético necesario para la reproducción. Además, en este período se observan niveles plasmáticos de  $T_3$  elevados en *R. perezi*. Existe, por tanto, la posibilidad de que las HT estén implicadas también en la movilización de las reservas energéticas durante la época de reproducción, como ya fue sugerido por Rosenkilde (1982).

En contraste con los anfibios urodelos, donde hay bastantes evidencias que indican que el tratamiento con  $T_4$  aumenta la preferencia por el medio terrestre mientras que la PRL induce el movimiento hacia el agua, la participación endocrina en la migración de anuros no está muy clara (véase Rankin, 1991). No se han observado aumentos en los niveles de PRL asociados con el movimiento hacia el agua ni en *B. japonicus* (Yoneyama *et al.*, 1984) ni en *R. esculenta* (Mosconi *et al.*, 1994). Sin embargo, algunos autores han relacionado altos niveles de  $T_4$  en plasma con las migraciones reproductoras y postreproductoras (Tasaki *et al.*, 1986; Saad y Ali, 1992), aunque posteriormente se ha encontrado un efecto inhibitor de la  $T_4$  sobre la locomoción en *B. japonicus* (Tasaki e Ishii, 1990a,b). Nuestros datos indican la existencia de niveles plasmáticos de HT elevados durante los períodos reproductor y postreproductor, apoyando la posible participación de las HT en la regulación del comportamiento migratorio, como ha sido sugerido en peces (Ueda *et al.*, 1984). Sin embargo, hasta el momento no se ha descrito la existencia de migraciones ligadas a la reproducción en *R. perezi* (García Paris, 1985).

En peces teleósteos parece claro que existe una conexión entre los ejes gonadal y tiroideo (Eales y Fletcher, 1982; Chakraborti y Bhattacharya, 1984). También se ha sugerido la existencia de una relación tiroides-gónadas en anfibios (Kühn *et al.*, 1990). En *R. perezi* el perfil estacional del desarrollo ovárico, representado por los cambios en el índice gonadosomático (IGS), comparte ciertas similitudes con el ciclo de  $T_3$  plasmática. Los valores más altos de IGS (hacia la mitad de la primavera) coinciden con altos niveles circulantes de  $T_3$ , aunque la regresión gonadal que se produce tras la reproducción tiene lugar un mes antes de que los niveles de  $T_3$  disminuyan. Estudios previos llevados a cabo en nuestro laboratorio demostraron que los niveles plasmáticos de  $E_2$  cambian de forma paralela al IGS, mostrando

valores máximos durante la época de reproducción (Delgado *et al.*, 1990), que ocurre en esta especie desde finales de Marzo hasta Junio, dependiendo de las áreas (García Paris, 1985). Por tanto, parece que los ciclos gonadal y tiroideo se superponen pero están ligeramente desplazados en el tiempo. Por otra parte, la proporción  $T_3/T_4$  plasmática aumenta en hembras desde Julio hasta Noviembre, sugiriendo, como ha sido anteriormente propuesto (Vandorpe *et al.*, 1987), una mayor necesidad de  $T_3$  durante la gametogénesis que vuelve a iniciarse en esta época (Delgado *et al.*, 1990). En los machos de *R. perezii* los niveles de testosterona en plasma siguen un patrón similar al descrito para el  $E_2$  en hembras (Delgado *et al.*, 1989), con lo que la relación entre los niveles plasmáticos de  $T_3$  y de testosterona sería análoga.

Con respecto a las posibles influencias de los factores ambientales, fotoperíodo y temperatura, sobre los cambios estacionales de la actividad tiroidea no parece que exista una relación simple. Encontramos niveles altos de HT en plasma durante los meses en los que fotoperíodo y temperatura van aumentando (Mayo-Julio). Sin embargo, se detectan niveles bajos de  $T_3$  plasmática en Agosto, cuando la temperatura y el fotoperíodo son todavía elevados. Más adelante (apartado 4. Regulación ambiental) discutiremos con detalle la influencia de estos factores ambientales sobre la actividad tiroidea de *R. perezii*.

### **3. REGULACIÓN ENDÓGENA DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA.**

#### **a) Control hipotalámico de la actividad tiroidea en larvas. Papel del CRF.**

Es bien conocido el papel de la TRH como principal regulador neuroendocrino de la secreción de TSH en mamíferos (Morley, 1981) y aves (Wentworth y Ringer, 1986). Sin embargo, aunque la TRH estimula la secreción de TSH en vertebrados poiquilothermos adultos (Darras y Kühn, 1982; Preece y Licht, 1987; Denver, 1988; Denver y Licht, 1989a; Jacobs y Kühn, 1992), es inactiva en la regulación de la secreción de TSH en anfibios larvarios (ver Norris y Dent, 1989; Denver y Licht, 1989b). De modo que la acción estimuladora de la TRH sobre la secreción de TSH en anfibios se desarrolla después de la metamorfosis (Jacobs *et al.*, 1988; Denver y Licht, 1989b).

Como hemos visto en la Introducción, un péptido CRF-"like" podría estar implicado en la regulación del eje tiroideo en adultos y larvas de anfibios anuros (Denver, 1988;

Denver y Licht, 1989b). Nuestros resultados demuestran que el CRF incrementa la concentración de HT en larvas prometamórficas de *R. perezii* (Gancedo *et al.*, 1992).

Utilizando técnicas de inmunocitoquímica se han localizado compuestos CRF-"like" en el hipotálamo y en la eminencia media de individuos adultos de varias especies de anfibios (Oliverau *et al.*, 1987; González y Lederis, 1988), así como en la eminencia media de larvas de *R. catesbeiana* (Carr y Norris, 1990). Por otra parte, se ha identificado al núcleo preóptico como el lugar principal de la síntesis del CRF en el cerebro de anuros adultos (Tonon *et al.*, 1985; González y Lederis, 1988) y parece ser un centro hipotalámico clave en el control de la metamorfosis (véase Norris y Dent, 1989). La existencia de una fuerte inmunorreactividad tipo CRF en la eminencia media sugiere que este péptido estaría pasando a la *pars distalis* hipofisaria a través del sistema porta hipotálamo-hipofisario (Oliverau *et al.*, 1987; González *et al.*, 1992). Recientemente, se ha identificado y caracterizado la estructura primaria del gen del CRF en *X. laevis* (Stenzel-Poore *et al.*, 1992), encontrándose que se expresa fundamentalmente en el núcleo preóptico y en el órgano paraventricular. Además, se ha observado que este CRF presenta una gran homología con el CRF de mamíferos y teleósteos, indicando que su secuencia está altamente conservada a lo largo de la escala filogenética, como había sido sugerido previamente (Lederis, 1987). Por otra parte, todos los CRF o péptidos CRF-"like" analizados hasta el momento poseen acciones biológicas casi idénticas, así como un espectro de actividad farmacológica similar (Lederis *et al.*, 1990). Los efectos paralelos que hemos encontrado sobre el eje tiroideo de larvas de anuros tras el tratamiento con hCRF y oCRF confirman esta similitud.

Estudios pioneros llevados a cabo por Denver (1988) demostraron que la hipófisis de individuos adultos de *R. pipiens* libera TSH en respuesta al oCRF utilizando un bioensayo homólogo. Resultados similares se han descrito recientemente en *R. esculenta* (Jacobs y Kühn, 1992). También se ha observado una acción positiva del oCRF sobre los niveles plasmáticos de  $T_4$  en adultos de *R. ridibunda* (Jacobs y Kühn, 1989). Sin embargo, estos mismos autores encontraron una falta de repuesta a inyecciones de oCRF en individuos neoténicos de *A. mexicanum* (Jacobs y Kühn, 1989). Estudios ultraestructurales llevados a cabo en individuos adultos de *R. perezii* han revelado que las células tirotrópicas de la hipófisis responden al oCRF con una estimulación de la síntesis y liberación de TSH *in vivo*, reflejado por el descenso del número y del volumen citoplasmático ocupado por los gránulos de secreción y por la hipertrofia del RER y del complejo de Golgi (Malagón *et al.*, 1991).

Además, Denver y Licht (1989b) observaron que la hipófisis de larvas prometamórficas de *R. catesbeiana* responde al tratamiento con oCRF con un incremento en la secreción de TSH. Nuestros datos complementan este último estudio, apoyando la hipótesis de que el CRF o un péptido CRF-"like" desempeña un papel en la iniciación de los sucesos metamórficos, como ya había sido sugerido (Denver y Licht, 1989b). De modo que el CRF actuaría como un neuroregulador común de la actividad tiroidea e interrenal durante la metamorfosis, a través de la estimulación de las células tirotrópicas y corticotrópicas de la hipófisis.

Nuestros resultados han sido confirmados recientemente por Denver (1993), el tratamiento crónico tanto con oCRF como con sovagina, un péptido CRF-"like" de origen anfibio, aceleró la metamorfosis en *R. catesbeiana* (familia ránidos) y *S. hammondi* (familia pelobátidos). Además, el tratamiento agudo con estos dos péptidos indujo un incremento en la concentración de  $T_4$  en *S. hammondi* (Denver, 1993).

Los mecanismos de acción del CRF son todavía desconocidos. El aumento en el número de folículos (Tabla XV), así como el incremento de la concentración total de HT observados tras el tratamiento con CRF en el presente estudio, sugieren que el CRF podría estar actuando directamente a nivel hipofisario, en lugar de la TRH, con una actividad liberadora de TSH durante la metamorfosis. Esto apoyaría la hipótesis de que las células tirotrópicas de la hipófisis de anfibios son menos específicas en su control hipotalámico que las de mamíferos.

También hemos observado que el tratamiento crónico con CRF estimula la metamorfosis. Este efecto estaría probablemente mediado por el aumento en la concentración de HT. Sin embargo, no podemos descartar la posibilidad de que este efecto del CRF pueda verse potenciado por un incremento simultáneo en la concentración de corticosteroides, ya que se sabe que estas hormonas sinergizan con las HT (White y Nicoll, 1981; Gray y Janssens, 1990) a través de un aumento de la unión nuclear de las mismas a nivel tisular (Kikuyama *et al.*, 1983; Suzuki y Kikuyama, 1983; Gray y Janssens, 1990) y probablemente también a través de efectos sobre la tasa de recambio de las HT, así como sobre la actividad desyodasa implicada en la transformación de  $T_4$  a  $T_3$  (Galton, 1990). Por otra parte, también hemos encontrado un retraso paralelo del crecimiento larvario como resultado del tratamiento crónico con CRF. Estudios previos indican que el CRF podría modular la liberación de PRL, pero no su síntesis, en rata (Morel *et al.*, 1989). Por tanto, es posible que el CRF, actuando como un agente dopaminérgico, inhiba la liberación de PRL que ejerce acciones tanto

procrecimiento como antimetamórficas. Esto podría resultar en una mejora en la efectividad de las HT. Datos preliminares obtenidos en el laboratorio del Dr. Kikuyama parecen indicar que el oCRF ( $10^{-6}$ M) induce un descenso en la secreción de PRL hipofisaria de *R. catesbeiana* a las 3 y 6 horas de cultivo (Gancedo *et al.*, datos sin publicar), aunque en otros experimentos en los que el oCRF procedía de una fuente comercial diferente se observó un cierto efecto estimulador a las 12 horas de cultivo.

Por otra parte, el CRF es uno de los neuropéptidos más importantes implicado en la regulación de la ingesta (Glowa *et al.*, 1992). En nuestro laboratorio hemos observado que el CRF induce una reducción de la ingesta en larvas de *R. perezi* (Corpas *et al.*, 1991) y en *Carassius auratus* (De Pedro *et al.*, 1993), como se ha observado también en vertebrados homeotermos (Parrot, 1990; Glowa y Gold, 1991). Además, muy probablemente el efecto del CRF se produce a nivel central, ya que sólo la administración intracerebroventricular, pero no la intraperitoneal, modifica el patrón alimenticio en *C. auratus* (De Pedro *et al.*, 1993). Asimismo, hemos observado que el CRF afecta al eje tiroideo de dos especies de teleosteos, *Tinca tinca* y *C. auratus* (De Pedro *et al.*, 1994a,b). Teniendo en cuenta que en teleosteos la alimentación tiene una influencia importante sobre la actividad tiroidea (Eales, 1988), podría ocurrir que los efectos del CRF sobre la función tiroidea estuvieran mediados por un descenso de la ingesta. Sin embargo, datos recientes parecen indicar que puede tratarse de efectos independientes (De Pedro *et al.*, 1994b).

Aunque no se conoce el significado fisiológico de estos resultados, la hipótesis de que un péptido CRF-"like" está implicado en el control de la función tiroidea durante la metamorfosis de anfibios anuros resulta todavía más firme si se tiene en cuenta que la activación del eje interrenal se produce antes del clímax (ver Dodd y Dodd, 1976). Además, los niveles de corticosteroides aumentan a partir de la prometamorfosis en adelante (ver Dent, 1988; Kikuyama *et al.*, 1986), y se ha demostrado que son estimulados por la secreción de ACTH inducida por CRF (Tonon *et al.*, 1986; Gracia-Navarro, 1992). Aún más, la inmunorreactividad CRF-"like" aumenta en la eminencia media de larvas de *R. catesbeiana* en prometamorfosis y clímax (Carr y Norris, 1990). Por último, la posibilidad de que el CRF tenga una importancia fisiológica en la regulación del eje tiroideo de larvas de anfibios es todavía más evidente por el hecho de que el tratamiento con antisueros anti-CRF produce un retraso del desarrollo metamórfico en *R. catesbeiana* (Denver, 1993).

Es importante destacar, no sólo que la regulación hipotalámica de la secreción hipofisaria muestra distintas especificidades entre los vertebrados, sino que además esta especificidad puede variar dependiendo del momento del ciclo vital del animal. En este sentido, la metamorfosis de anfibios representa un modelo idóneo para el estudio de las posibles modificaciones asociadas al desarrollo.

La realización de experimentos con larvas hipofisectomizadas y la valoración de la concentración de corticosteroides tras el tratamiento con CRF, así como la administración de antagonistas proporcionarían una información muy valiosa para intentar aclarar el lugar y mecanismos de acción del CRF.

### **b) Interacciones pineal-tiroides-gónadas.**

La melatonina se produce en la glándula pineal y la retina de la mayoría de los vertebrados (Skene *et al.*, 1991). Baker (1969) y Baker y Hoff (1971) mediante espectrofluorometría demostraron que los niveles de MEL cambian a lo largo del desarrollo de *X. laevis*, y que además los ojos contenían el 75-90 % del contenido total de esta hormona en las larvas. Estudios pioneros sobre la función de la MEL en anfibios indicaron que ésta producía la agregación del pigmento en los melanóforos y parecía tener un efecto antimetamórfico (Bagnara, 1963; Remy y Disclos, 1970). Recientemente, se ha observado (Delgado *et al.*, comunicación personal) que la ceguera practicada en estados tempranos del desarrollo en *X. laevis* induce el oscurecimiento total de las larvas y una aceleración del crecimiento, confirmando la importancia de la MEL ocular en esta especie. En nuestro laboratorio se ha relacionado a la MEL con los procesos de crecimiento y desarrollo metamórfico en larvas de varias especies de anuros (*D. pictus*: Gutiérrez *et al.*, 1984; Delgado *et al.*, 1984, Alonso-Bedate *et al.*, 1985; *R. perezi*: Delgado *et al.*, 1984; *X. laevis*: Delgado *et al.*, 1987), siendo corroborado en estudios posteriores con *X. laevis* (Edwards y Pivorun, 1991) y *R. pipiens* (Wright *et al.*, 1991). La respuesta a la MEL depende de las especies, del ciclo luz/oscuridad, de la dosis de MEL utilizada y de la vía de administración entre otros factores, aunque en general se ha observado un retraso en el crecimiento y desarrollo metamórfico de anuros.

La enzima serotonina N-acetiltransferasa (NAT) es considerada como la enzima más importante en la regulación de la ruta biosintética de la MEL, tanto en la pineal como en la retina de todos los vertebrados estudiados hasta el momento (Zawilska y Nowak, 1992),

observándose niveles de actividad bajos durante el día y altos durante la noche, lo que determina los ritmos diarios de producción de MEL (Binkley, 1981). Recientemente, y como resultado de trabajos realizados en nuestro laboratorio, se ha descrito la ontogenia del ritmo diario de la actividad NAT ocular en cuatro especies de anuros (Alonso-Gómez *et al.*, 1994). El primer ritmo significativo de NAT se observa al comienzo de la ingestión (25 G) en *R. perezi* y se mantiene a lo largo del desarrollo con la acrofase en la primera mitad de la fase oscura del fotociclo diario, aunque se produce una atenuación de la actividad enzimática a lo largo de la ontogenia (Alonso-Gómez *et al.*, 1994). Los niveles medios más elevados de HT también se observan en la primera mitad de la fase oscura en el estado 26-27 G, de manera que los perfiles son similares. Esta similitud, asumiendo que la MEL presenta un patrón diario equivalente al de la NAT, sugiere que la MEL podría estar influyendo en los cambios diarios de HT observados a partir de la premetamorfosis.

En los estudios llevados a cabo en la presente Memoria, para intentar aclarar el papel de la MEL en relación a la función tiroidea en larvas, hemos encontrado que el tratamiento agudo (12 h durante la fase oscura) con esta hormona incrementa la concentración de  $T_4$  en larvas prometamórficas de *R. perezi*, sin afectar a la concentración de  $T_3$  y por tanto, con el consiguiente descenso significativo de la relación  $T_3/T_4$ . Por otra parte, la eliminación de una noche (tratamiento agudo 24L, que anularía la producción endógena de MEL; Pang *et al.*, 1985) disminuye significativamente la concentración tanto de  $T_3$  como de  $T_4$ , efecto que se compensa con la administración de MEL en el caso de la  $T_3$ , y que incluso se sobrecompensa en el caso de la  $T_4$ . De modo que, a pesar de que la administración crónica de MEL generalmente ha producido efectos depresores sobre el crecimiento y la metamorfosis de anfibios anuros, la presencia de MEL nocturna parece ser necesaria para el funcionamiento normal del eje tiroideo, probablemente actuando como señal mediadora en la integración de la información fotoperiódica, es decir como indicador de la fase nocturna que sería necesaria para la expresión de los ritmos diarios de actividad tiroidea. Incluso podríamos pensar en un efecto estimulador de la MEL sobre la función tiroidea en larvas de *R. perezi*, como se había sugerido previamente en individuos neoténicos de *A. tigrinum* (Norris *et al.*, 1981). El hecho de que el efecto de la MEL sobre la concentración de  $T_4$  sea mucho mayor cuando se administra en ausencia de noche (24L) parece lógico debido a la dosis farmacológica utilizada y a la reducción de la hormona endógena inducida por la luz constante, no teniendo que competir por la unión a sus receptores. El grado de desarrollo metamórfico de las larvas de *R. pipiens* fue máximo cuando se aplicaba un pulso de luz de

una hora de duración antes de administrar  $T_4$  al inicio de la fase oscura (Wright *et al.*, 1988b). Teniendo en cuenta nuestros resultados podría ocurrir que el pulso de luz redujera los niveles endógenos de HT de forma que el efecto de la hormona exógena se viera favorecido. Por otra parte, se ha observado que el tratamiento agudo con luz constante hace desaparecer el ritmo de TSH en rata (Murakami *et al.*, 1988).

Otra posibilidad a tener en cuenta, ya sugerida por otros autores (Wright *et al.*, 1990b) y apoyada por nuestros datos, es que la MEL esté implicada como mediador de los efectos del ciclo luz/oscuridad sobre las HT, como hemos propuesto anteriormente, o incluso sobre otras hormonas que interaccionan con la  $T_4$  durante la metamorfosis (corticosteroides, PRL). En este sentido, datos recientes indican un efecto estimulador de la MEL sobre la liberación de PRL en humanos (Terzolo *et al.*, 1991, 1993), aunque un efecto opuesto ha sido descrito en oveja (Malpaux *et al.*, 1993). Experimentos preliminares llevados a cabo en el laboratorio del Dr. Kikuyama sugieren que la MEL podría estar afectando a la secreción *in vitro* de hormonas hipofisarias en *R. catesbeiana*, ya que se observó que la MEL ( $10^{-8}M$ ) tendía a reducir los niveles de PRL a las 24 horas de cultivo, mientras que inducía un descenso de los niveles de GH a las 6, 12 y 24 horas de cultivo (Gancedo *et al.*, datos sin publicar).

Es importante destacar que, en el presente trabajo, también observamos un aumento en la concentración de  $T_3$  tras la administración aguda de  $T_4$  durante la fase oscura del fotociclo que no se vio afectado por el tratamiento conjunto con MEL. Sin embargo, cuando se privó de la noche a las larvas la concentración de  $T_3$  fue significativamente menor en el grupo tratado únicamente con  $T_4$ , tanto respecto a su grupo control (12L:12D,  $T_4$ ) como respecto a su homólogo tratado adicionalmente con MEL (24L,  $T_4$ +MEL). Estos resultados sugieren que la ausencia de noche (descenso de MEL) podría estar afectando no sólo a la producción de HT, como indicaban los resultados anteriores, sino también a la desyodación periférica. En este sentido, se ha descrito en la rata la desaparición del ritmo diario de la actividad 5'D tipo II en la hipófisis, pero no en la pineal, tras el tratamiento agudo con luz constante (Murakami *et al.*, 1988). Sin embargo, no se puede descartar un aumento en la degradación de HT como explicación global, ya que en hamsters tratados con  $T_4$ +MEL se observan niveles plasmáticos de  $T_4$  inferiores a los encontrados en los animales tratados únicamente con  $T_4$  (Creighton y Rudeen, 1989). De hecho, aunque la proporción  $T_3/T_4$  tiende a disminuir en el grupo de 24L, la reducción no es estadísticamente significativa respecto al control. Sin embargo, el tratamiento con MEL produce un descenso de esta relación cuando



se administra durante la fase oscura del fotociclo diario (12L:12D), disminución que es mucho más acusada en el caso del grupo 24L, luego, probablemente, la MEL está afectando a la secreción y/o metabolismo de las HT.

En adultos de *R. perezi* se ha observado que la MEL ocular contribuye de una manera importante a los niveles circulantes de esta hormona (Delgado y Vivien-Roels, 1989). Por otra parte, recientemente se han descrito los cambios estacionales de las variaciones diarias de MEL en la retina de *R. perezi*, mostrando valores nocturnos elevados con un máximo al principio de la fase oscura y valores diurnos muy bajos en todas las estaciones (Delgado *et al.*, 1993). En este estudio, las oscilaciones diarias máximas en la producción de MEL se detectaron en verano, mientras que la ritmicidad circadiana desaparecía en invierno. En el presente estudio los niveles plasmáticos de  $T_3$  durante la noche son inferiores a los valores diurnos en todas las estaciones del año, a excepción del invierno cuando la ciclicidad fue nula. Además, en primavera los contenidos tiroideos de  $T_3$  (libre y unida) son elevados, mientras que los niveles plasmáticos de  $T_3$  disminuyen, coincidiendo con el aumento en la producción de MEL, estos paralelismos podrían apuntar hacia una influencia inhibidora de la MEL sobre la función tiroidea, y más concretamente sobre la liberación y secreción de HT en *R. perezi*. Aunque la acrofase de la producción de MEL se conservó a lo largo de las diferentes estaciones, la duración de la elevación nocturna fue máxima en otoño (Delgado *et al.*, 1993), lo que también podría estar relacionado con el cambio de fase observado en la fracción unida de HT en el tiroides durante esta estación. Por el contrario, se ha descrito la coexistencia de niveles altos de MEL y  $T_4$  en plasma al principio de la fotofase en individuos neoténicos de *A. tigrinum* en primavera (Norris *et al.*, 1981). En nuestro estudio no se han observado cambios diarios en el contenido tiroideo de HT en verano, cuando la producción nocturna de MEL es máxima (Delgado *et al.*, 1993), lo que parecería discordante con la hipótesis de un efecto antitirotrópico de la MEL (véase Vriend, 1983a,b). Sin embargo, existe la posibilidad de que los cambios diarios en la actividad tiroidea puedan ser diferentes dependiendo del sexo, ya que en esta época del año sólo se utilizaron machos, lo que nos impulsó a realizar un estudio de la actividad tiroidea de machos y hembras de *R. perezi* por separado a lo largo del ciclo estacional, y que como hemos visto en el apartado de Resultados y discutido previamente, reveló la existencia de diferencias sexuales.

Por otra parte, la pinealectomía y la ceguera (Px+Cx) de hembras de *R. perezi* de verano no modificó los niveles plasmáticos de HT en ninguno de los dos momentos del

fotociclo diario evaluados, a diferencia de los resultados obtenidos en la rata (Kniazewski *et al.*, 1990). Sin embargo, sí encontramos una reducción significativa del contenido tiroideo de  $BT_4$  en el grupo de Px+Cx durante la noche, lo que podría estar indicando un descenso en la síntesis de HT. En este sentido, datos previos indican un descenso, dependiente del ciclo gonadal, en la captación tiroidea de yodo tras pinealectomía en el pez gato (Agha y Joy, 1987). En el presente estudio también observamos un descenso significativo de la relación  $FT_3/FT_4$  en este mismo grupo experimental (Px+Cx) durante el día. Del análisis de estos resultados parece deducirse que en verano la Px+Cx, y por tanto el supuesto descenso de los niveles endógenos de MEL, tiende a inhibir la actividad tiroidea durante la noche, momento en el que la MEL muestra los niveles máximos en situaciones normales, mientras que durante el día se observaría la tendencia opuesta como consecuencia de un efecto rebote (de hecho existe una interacción entre el tratamiento quirúrgico y el momento del fotociclo diario). Por tanto, parece que, al igual que ocurría en larvas, la MEL nocturna sería necesaria para la expresión de los cambios diarios normales de la actividad tiroidea y la eliminación de esta señal integradora provoca cambios en la ritmicidad. En este sentido, la pinealectomía en animales poiquiloterms provoca cambios en la ritmicidad (Underwood, 1990).

Sin embargo, no podemos descartar que, como proponíamos antes, la MEL posea una actividad antitirotrópica en otras estaciones del año, y dependiendo del estado gonadal de los animales. Tanto la pinealectomía como la ceguera retrasan la regresión gonadal en hembras de *R. perezi* mantenidas a temperatura alta en otoño, situación que reproduciría lo que ocurre en verano (Alonso-Gómez *et al.*, 1990). Nosotros hemos observado también un incremento significativo del índice gonadosomático en el grupo Px+Cx. Asimismo, tanto la pinealectomía como la ceguera, inducen un incremento de los niveles plasmáticos de  $E_2$  durante la noche en *R. perezi* (Alonso-Gómez *et al.*, 1990), habiéndose descrito un efecto depresor de la MEL sobre los niveles plasmáticos de  $E_2$  en hamster (Vriend *et al.*, 1987).

El aumento de los índices hepatosomático y de cuerpos grasos tras la pinealectomía y la ceguera observado en el presente estudio respecto al control, indicaría un retraso en la utilización de las reservas energéticas, concordando con datos obtenidos previamente en hembras de *R. perezi* (Alonso-Gómez *et al.*, 1990), y apoyando una participación de la MEL en el metabolismo energético.

En definitiva, la pineal y los ojos, a través de la MEL, no se pueden definir como inhibidores o activadores en relación a actividades fisiológicas tales como la tiroidea y la

gonadal, sino más bien como intermediarios entre el ambiente y el animal, como ha sido previamente sugerido (Reiter, 1991a).

Volviendo a la relación del eje tiroideo con otros ejes neuroendocrinos en larvas de anfibios, como sabemos, las HT son las principales responsables de la metamorfosis de anfibios, aunque otras hormonas, fundamentalmente la PRL y los corticosteroides, interaccionan con las HT y son importantes también en la determinación de los procesos metamórficos. Los esteroides gonadales también parecen estar implicados en estos sucesos, sin embargo la bibliografía disponible al respecto no es muy abundante, a la par que bastante antigua, y los resultados obtenidos son inconsistentes, de manera que se han descrito tanto efectos estimuladores como inhibidores de diversos esteroides gonadales sobre la metamorfosis inducida por  $T_4$  o por TSH (véase Gray y Janssens, 1990 y citas incluidas).

Nuestros estudios realizados en larvas prometamórficas de *R. perezii* indican que el tratamiento agudo, tanto con  $E_2$  como con testosterona, produce una reducción significativa de la concentración de  $T_4$  sin afectar a la concentración de  $T_3$ , con el consiguiente incremento de la relación  $T_3/T_4$ . Estos resultados concuerdan con trabajos previos en los que se observó que el tratamiento con testosterona y  $E_2$  aumentaba la duración del período larvario en *R. pipiens* (Richards y Nace, 1978) e inhibía el crecimiento y el desarrollo a 27°C en *Bufo boreas* (Hayes *et al.*, 1993). Recientemente se ha descrito una acción inhibidora tanto de testosterona como de  $E_2$  sobre la metamorfosis inducida por  $T_3$  en *X. laevis in vivo*, pero no *in vitro* (Gray y Janssens, 1990), sugiriendo que la acción de estos esteroides no se lleva a cabo a nivel tisular, sino que podrían estar actuando sobre el eje tiroideo, como nuestros resultados parecen indicar, aunque un incremento en la degradación de  $T_4$  no se puede descartar. Estudios realizados en otros vertebrados poiquiloterms apoyarían la hipótesis de una acción de los esteroides gonadales en algunos eslabones del eje hipotálamo-hipófisis-tiroides (Olivereau *et al.*, 1981; Leatherland, 1985; Ikuta *et al.*, 1987), habiéndose descrito incluso la existencia de una acción directa del  $E_2$  sobre la secreción tiroidea de  $T_4$  (Bandyopadhyay *et al.*, 1991).

Por otra parte, también existe la posibilidad de que no sea un efecto directo del  $E_2$ , sino que esta hormona esté afectando a otros sistemas endocrinos que actuarían como intermediarios. En este sentido, se han descrito receptores de  $E_2$  en la glándula pineal y la retina de *Oncorhynchus mykiss*, habiéndose observado que este esteroide sexual es capaz de modular la secreción de MEL en células pineales *in vitro* (Begay *et al.*, 1994). Dosis

fisiológicas de  $E_2$  (nM) inhiben en este teleosteo la secreción de MEL tras el tratamiento agudo (12 horas durante la fase oscura), mientras que dicho efecto es revertido a dosis superiores ( $\mu M$ ) y llegando a producir el efecto contrario (estimulador) en el rango mM (Begay *et al.*, 1994). Los niveles plasmáticos de esteroides gonadales no se han determinado todavía durante la metamorfosis de anfibios, pero nosotros hemos observado en otros experimentos presentados en esta Memoria (Resultados, 6.1.2.c), que la concentración total de  $E_2$  en larvas prometamórficas es del orden de nM. La dosis de  $E_2$  utilizada en el tratamiento agudo de larvas prometamórficas de *R. perezii* estaba en el rango  $\mu M$ , muy superior a la fisiológica, sin embargo debemos considerar la vía de administración que, en nuestro caso, fue por inmersión de los animales en la solución de esteroides, de manera que, a pesar de la alta permeabilidad de la piel de los anfibios, muy probablemente los niveles alcanzados en circulación y en los tejidos sean mucho menores. En este sentido, recientemente se ha demostrado que los esteroides sexuales administrados por inmersión no se acumulan en las larvas de anuros sino que son metabolizados (Hayes y Licht, 1993). Como hemos visto, el tratamiento agudo con MEL produce un incremento de la concentración de  $T_4$ . Por tanto, de la consideración conjunta de los resultados obtenidos en los distintos estudios realizados, surge la posibilidad de que el efecto del  $E_2$  sobre la actividad tiroidea, observado en larvas de *R. perezii*, pueda estar mediado por un descenso en los niveles de MEL. En otras palabras, la pineal y la retina, a través de la MEL, podrían estar integrando información, no sólo procedente del medio ambiente (fotoperíodo y/o temperatura), sino también procedente de los mensajeros químicos internos.

La diferenciación de las gónadas en anfibios se realiza durante el período larvario que tiene lugar tras la eclosión, siendo posible la reversión de sexo durante un cierto período crítico mediante la administración exógena de esteroides sexuales (véase Adkins-Regan, 1987; Villalpando y Merchant-Larios, 1990), probablemente debido a alteraciones de la ruta esteroidogénica (Hsu *et al.*, 1988; Yu *et al.*, 1993). Se han realizado bastantes estudios en larvas de *R. catesbeiana* que han puesto de manifiesto que el ovario de las larvas es capaz de sintetizar  $E_2$  desde el estado X TK (Hsu *et al.*, 1985a,b), independientemente de la hipófisis (Hsu *et al.*, 1989). Aunque tradicionalmente se tenía la creencia de que el tiroides no desempeña un papel importante en la gametogénesis durante la metamorfosis (Dodd y Dodd, 1976), existen datos a favor de esta relación y parecen indicar una influencia negativa del tiroides. Así, la tiroidectomía quirúrgica induce un aumento del tamaño de los ovocitos

en *R. pipiens* (véase Dodd y Dodd, 1976) y la tiroidectomía química acelera la espermatogénesis en *Hynobius retardatus* (Wakahara, 1994). Sin embargo, recientemente se ha descrito un efecto estimulador de la  $T_3$  sobre la diferenciación gonadal en larvas de *Bufo arenarum* (Rengel y Pisano, 1990). Nuestros resultados indican que el tratamiento agudo con  $T_3$ , pero no con  $T_4$ , aumenta significativamente la concentración de  $E_2$ , pero no de testosterona, si bien existe una correlación positiva entre  $E_2$  y testosterona, como era de esperar. Estos datos concuerdan con la observación de un incremento progresivo en la síntesis y secreción de  $E_2$  *in vitro* desde el estado X al estado XXV TK en *R. catesbeiana* (Hsu *et al.*, 1985b, 1989), de manera que según aumenta la concentración de  $T_3$  aumentaría la de  $E_2$ , sugiriendo, en contra de lo que se creía, que el tiroides afecta (positivamente) al desarrollo gonadal durante la metamorfosis de anfibios y reforzando una vez más el papel predominante de la  $T_3$  frente a la  $T_4$ , y por tanto la importancia de la desyodación periférica, en la determinación de los sucesos metamórficos.

Por otra parte, el tratamiento con MEL también produjo un incremento en la concentración de  $E_2$ . La MEL está implicada, entre otras funciones, en el control del desarrollo, crecimiento y maduración sexual (Collin *et al.*, 1988; Reiter, 1991b; Zachmann *et al.*, 1992), atribuyéndosele en general acciones inhibitoras. Sin embargo, también se han descrito en muchas ocasiones efectos estimuladores sobre cada uno de estos procesos (Vriend *et al.*, 1990; Reiter, 1991c; Schlatt *et al.*, 1993). Los resultados obtenidos en esta Memoria parecen indicar que la MEL podría tener un efecto activador, tanto sobre el eje gonadal como sobre el eje tiroideo, durante la metamorfosis de *R. perezi*. Teniendo en cuenta que la  $T_3$  provoca un aumento de la concentración de  $E_2$  en las larvas, podríamos pensar que esta acción de la MEL sobre los esteroides gonadales estuviera mediada por las HT. No obstante, debemos recordar que la MEL sólo produce un incremento significativo de la concentración de  $T_4$  y que, sin embargo, no se observa un efecto positivo de la  $T_4$  sobre la producción de  $E_2$ . Por el contrario, cabe la posibilidad de que la relación sea a la inversa, es decir que la acción de la  $T_3$  se produzca a través de un incremento de los niveles de MEL, puesto que se ha descrito una acción estimuladora de las HT sobre la producción de MEL *in vitro* (referencias en Tanaka *et al.*, 1987). Por último, debemos considerar que, como hemos citado previamente, la MEL inhibe el crecimiento durante la ontogenia de los anfibios anuros, pudiendo estar afectando a la secreción hipofisaria de hormonas tales como la PRL o la GH, que a su vez influirían, directa y/o indirectamente, sobre el desarrollo en general,

incluyendo el de las gónadas. Para intentar desvelar estas incógnitas sería interesante valorar MEL en larvas tratadas con HT, así como determinar la concentración de PRL tras el tratamiento con MEL.

Con el objeto de profundizar en las posibles interacciones de los ejes tiroideo y gonadal en individuos adultos de *R. perezi*, llevamos a cabo diversos experimentos (Materiales y Métodos, 2.8.4.2.b) cuyos resultados discutiremos a continuación.

La ovariectomía (Ovx), como era de esperar, indujo un descenso significativo de los niveles de  $E_2$  tanto a los 7 como a los 30 días en *R. perezi*, así como una tendencia a la reducción de los índices de cuerpos grasos y oviductosomático probablemente asociados al descenso del  $E_2$ . Ahora bien, lo más interesante resultó ser el descenso paralelo de los niveles plasmáticos de  $T_3$  y  $T_4$  que fue significativo a los 7 días de la ovariectomía (Ovx7). Resultados similares se han descrito en hembras de *R. ridibunda* a los 11 días de la extirpación gonadal, si bien en este caso sólo se observó un descenso de los niveles de  $T_4$ , pero no de  $T_3$  ni de la actividad 5'D renal (Kühn *et al.*, 1990). En *R. perezi* tampoco parece que la desyodación periférica se vea afectada significativamente, aun a pesar de que la relación  $T_3/T_4$  presenta valores medios superiores en el grupo Oxv7 con respecto a los animales control. En cuanto a los contenidos tiroideos de HT, observamos un incremento en los contenidos medios de HT tanto libres como unidas a los 7 días de la ovariectomía, aunque sólo fue estadísticamente significativo en el caso de las fracciones unidas, de manera que el tiroides presentaría un cierto estado de hiperactividad en relación a los controles. Esta respuesta podría justificarse en base a un incremento en la secreción de TSH como consecuencia de una cierta liberación del "feed-back" negativo que las HT ejercen sobre la hipófisis (Jacobs y Kühn, 1992). Sin embargo, la gonadectomía en machos de *R. ridibunda* no parece afectar a la actividad tiroidea (Kühn *et al.*, 1990). El hecho de que a los 30 días de la ovariectomía no se observen diferencias significativas, con la excepción de los niveles plasmáticos de  $T_4$ , podría deberse a que el estado de desarrollo y endocrino, tanto gonadal como tiroideo, de los animales fuera diferente pudiendo afectar a las posibles interrelaciones de estos dos ejes, ya que los niveles de  $E_2$  fueron mucho más elevados en el Control30 que en el Control7. Por otra parte, debemos considerar que, a los 30 días de la ovariectomía las alteraciones endocrinas y metabólicas, como consecuencia del descenso prolongado del  $E_2$ , pueden ser múltiples conduciendo a una situación de compensación que podría enmascarar los efectos observados a los 7 días.

Algunos datos parecen indicar un efecto directo de los estrógenos sobre la secreción tiroidea en peces (Bandyopadhyay *et al.*, 1991), habiéndose descrito la existencia de R de estrógenos en el tiroides de humanos (Hiasa *et al.*, 1991). Por el contrario, nuestros resultados de los experimentos *in vitro* indican que los estrógenos actuarían a nivel central en anfibios, ya que el E<sub>2</sub> no modificó la secreción de HT *in vitro*; tampoco podemos descartar un efecto periférico afectando al metabolismo de HT. Puesto que se ha demostrado que la GnRH en anfibios adultos estimula el eje tiroideo (Denver, 1988; Jacobs y Kühn, 1988, 1992), una posibilidad bastante atractiva sería que el E<sub>2</sub> actuase a nivel hipotálmico y/o hipofisario modificando la producción de GnRH o modulando los receptores de GnRH hipofisarios, respectivamente, como se ha sugerido con anterioridad en mamíferos (Wang *et al.*, 1987).

Para completar el cuadro de análisis de las interacciones entre los ejes tiroideo y gonadal en individuos adultos de *R. perezii*, a continuación pasaremos a discutir la posibilidad de un control en el sentido contrario, es decir la influencia de la actividad tiroidea sobre la función gonadal.

Los inhibidores tiroideos (IOP+PTU) incrementan la T<sub>4</sub> plasmática en hembras de *R. perezii*. Este efecto se explicaría en base a la inhibición de la 5'D periférica tipo II ejercida por el IOP (Guerrero *et al.*, 1990; Redjem *et al.*, 1990), reflejándose en una reducción de la proporción T<sub>3</sub>/T<sub>4</sub> plasmática. Por otra parte, el PTU inhibe tanto la yodación de la Tg catalizada por la peroxidasa tiroidea como a la 5'D tipo I (Taurog *et al.*, 1989; Kühn *et al.*, 1993b). En nuestro caso, la utilización conjunta de estos dos inhibidores de la actividad tiroidea, tenía como objetivo suprimir la producción de HT tanto en el tiroides como en circulación (T<sub>3</sub>). Sin embargo, con este tratamiento no se consiguió un descenso de los niveles plasmáticos de T<sub>3</sub>, resultado que podría justificarse en base a varias posibilidades. Por un lado, debido a una hipersecreción de TSH como consecuencia de la inhibición de la 5'D en la hipófisis y a la inhibición de la 5D periférica que degrada la T<sub>3</sub>, como se ha sugerido en otros vertebrados (Redjem *et al.*, 1990). El tratamiento con tiourea, otro compuesto antitiroideo, induce hipertrofia y desgranulación de las células tirotrópicas hipofisarias, que también reflejarían una hipersecreción de TSH, en *B. melanostictus* (Masood-Hussain y Saidapur, 1982) y *Rana cyanophlyctis* (Saidapur y Masood-Hussain, 1986). Resultados similares a los presentados en esta Memoria se han observado en hembras de *R. temporaria* tras inyección con IOP durante 4 días, encontrándose un incremento de los niveles

plasmáticos de  $T_4$  y un descenso de la actividad 5'D renal (Kühn *et al.*, 1990).

Por otro lado, la falta de efectividad del tratamiento (IOP+PTU), en cuanto a la consecución de un descenso de los niveles plasmáticos de  $T_3$ , podría deberse a una corta duración del tratamiento y/o a una interacción de estos dos compuestos, ya que mientras que el IOP tiende a aumentar los niveles de  $T_4$  en plasma, el tratamiento con PTU presenta la tendencia opuesta (véase Holbeck *et al.*, 1993). En cuanto a los efectos de este tratamiento sobre el contenido tiroideo de HT, no observamos diferencias respecto a los controles en ningún caso, si bien los contenidos medios de HT libres fueron superiores en el grupo tratado con IOP+PTU. De manera que, mientras que el tratamiento con IOP parece haber provocado los resultados esperados, el PTU puede no haber ejercido ningún efecto. Sin embargo, el hecho de que la fracción libre de HT tienda a ser mayor que en los controles, mientras que las fracciones unidas no difieren, parecería indicar que el procesamiento de la Tg posterior a la yodación estaría estimulado en cierta medida debido a la ya mencionada hipersecreción de TSH, pero no se produciría un incremento en la cantidad de HT unidas debido al hipotético bloqueo de la yodación provocado por el PTU. Por otra parte, recientemente se ha comprobado que el PTU presenta acciones diversas sobre otros procesos fisiológicos (Hicks *et al.*, 1992; Kai *et al.*, 1993; Elias *et al.*, 1993) e incluso induce un incremento en la expresión del gen de la Tg (Leer *et al.*, 1991).

En nuestro estudio no se observaron cambios significativos en los niveles plasmáticos de  $E_2$  en el grupo IOP+PTU con respecto al control, aunque los niveles medios fueron superiores en el mencionado grupo experimental. En hembras de *R. temporaria* el tratamiento con IOP indujo un descenso de los niveles de  $E_2$  en plasma. Sin embargo, la implantación de cápsulas silásticas que contenían IOP en machos y hembras de *R. ridibunda* provocó un incremento de los niveles plasmáticos de  $T_4$  y una reducción de la 5'D a los 7 días similar a la observada en *R. temporaria* y *R. perezi*, pero ni afectó a los niveles plasmáticos ni a los gonadales de los correspondientes esteroides, testosterona o  $E_2$  (Kühn *et al.*, 1990). Además el tratamiento de machos de *R. ridibunda* con otro compuesto antitiroideo muy utilizado en mamíferos, el metimazol, tampoco afectó a los niveles de testosterona en plasma, mientras que indujo una depresión de los niveles plasmáticos de  $T_4$  y de la actividad 5'D renal (Kühn *et al.*, 1990). En machos de *R. perezi* tampoco se ha observado ningún efecto del tiouracilo sobre los niveles de testosterona en plasma o el índice gonadosomático, asimismo tampoco se vio afectada la respuesta a la gonadotropina coriónica humana (Domínguez *et al.*, 1991).

La administración de  $T_3$  exógena en hembras de *R. perezi* que habían sido tratadas



con IOP+PTU revierte los efectos observados sobre los niveles de  $T_4$  plasmática, probablemente debido al "feed-back" negativo ejercido por la  $T_3$ , y lógicamente incrementó los niveles plasmáticos de  $T_3$  con el consiguiente aumento de la relación  $T_3/T_4$ . Sin embargo, tampoco observamos un efecto significativo de este tratamiento sobre los niveles de  $E_2$  en plasma, aunque los niveles medios descienden con respecto al grupo tratado únicamente con IOP+PTU. El perfil de los cambios plasmáticos de  $E_2$  es muy similar al de  $T_4$ , lo que podría sugerir un posible efecto de  $T_4$ , y no de  $T_3$ , sobre la actividad gonadal en adultos, en contraste con lo observado en las larvas de *R. perezii*. Sin embargo, no existe correlación entre los niveles plasmáticos de  $T_4$  y de  $E_2$ , con lo que queda descartada esta posibilidad.

El contenido tiroideo de HT libres, así como su relación, muestra un marcado paralelismo con lo observado en plasma, lo que parece indicar que efectivamente la fracción libre representa la hormona que está preparada para ser liberada al torrente circulatorio, teniendo en cuenta que además la desyodación periférica está inhibida en los grupos experimentales. De hecho existe una correlación positiva entre la  $T_3$  plasmática y la libre. Por otra parte, en el grupo tratado con IOP+PTU+ $T_3$  se aprecia un incremento significativo del contenido tiroideo de HT unidas a Tg tanto respecto al control como al tratado únicamente con IOP+PTU.

Estudios llevados a cabo en nuestro laboratorio parecen indicar una falta de efecto de las HT sobre la actividad gonadal en machos de *R. perezii*, ya que la administración de  $T_3$  y  $T_4$  tampoco afectó a los niveles de testosterona en plasma ni al índice gonadosomático (Domínguez *et al.*, 1991).

De lo anteriormente expuesto podría deducirse que la actividad tiroidea no tiene ninguna influencia sobre el eje gonadal en hembras de *R. perezii*. Sin embargo, puede ocurrir que el estado gonadal de los animales fuera refractario al posible efecto de las HT sobre la esteroidogénesis debido a la época del año en que se realizaron los experimentos (Julio), ya que tras la puesta se inicia la regresión ovárica en *R. perezii* (Delgado *et al.*, 1990) y el índice gonadosomático presentó valores mínimos en todos los grupos. Sin embargo, sí observamos un aumento del índice oviductosomático, así como un descenso del índice de cuerpos grasos, en los animales tratados con IOP+PTU que recuperan valores similares a los controles tras la administración de  $T_3$ . El desarrollo del oviducto es dependiente de estrógenos (Alonso-Bedate *et al.*, 1976), luego, a pesar de que los niveles medios de  $E_2$  más elevados de este grupo no diferían estadísticamente de los controles, sí fueron suficientes para inducir un incremento del peso del oviducto y parece claro que las HT están implicadas en

este proceso puesto que la administración conjunta de  $T_3$  revertía la situación. En cuanto a los cambios observados en los cuerpos grasos, podrían ser más bien la consecuencia de alteraciones metabólicas que podrían estar relacionadas con el aumento de la  $T_4$  plasmática, ya que se ha demostrado la participación de las HT en la movilización de las grasas (Kar y Chandola-Saklani, 1985) y además se ha observado que la  $T_4$  moviliza el colesterol ovárico en respuesta a las gonadotropinas (Sen y Bhattacharya, 1981).

Estudios previos realizados en rata sugieren que la  $T_4$  parece ejercer un efecto antagónico al del  $E_2$  sobre la liberación de la LH hipofisaria y de la GnRH hipotalámica (Wang *et al.*, 1987). Nuestros resultados *in vitro* indican que las HT en *R. perezii* pueden afectar de forma directa a nivel ovárico. Así, observamos que la  $T_3$  induce un descenso significativo de la producción de  $E_2$  a las 6, 9 y 12 horas de cultivo, así como un descenso de la producción de testosterona a las 9 horas, lo que podría indicar un efecto inhibitor sobre la esteroidogénesis en un paso anterior a la formación de testosterona. En este sentido, se han descrito posibles receptores de HT en el ovario de al menos una especie de teleosteo (Chakraborti *et al.*, 1986). Nuestros resultados *in vitro* apoyarían lo observado *in vivo*, ya que, aunque los niveles de  $T_3$  plasmática no disminuyeron significativamente en el grupo IOP+PTU, es posible que se produjera un descenso de los niveles intracelulares de  $T_3$ , de forma que la inhibición de la producción de  $E_2$  se atenúe observándose el incremento en los niveles de  $E_2$  en plasma cuya modestia sería debida al estado refractario gonadal citado anteriormente. Por otra parte, se aprecia un incremento significativo en la producción de progesterona a las 3 horas de cultivo. La progesterona induce *in vitro* la maduración ovárica en *R. perezii* (Alonso-Bedate *et al.*, 1974; Gancedo, 1988). La  $T_3$  ha sido implicada en la maduración ovárica en peces, observándose una acción potenciadora del efecto estimulador de las gonadotropinas sobre la maduración ovárica *in vitro* (Sullivan *et al.*, 1989) aunque no actúa en ausencia de gonadotropinas ni afecta a los niveles plasmáticos de  $E_2$  cuando se inyecta en hembras de *S. gairdneri* en el momento de la puesta. Sin embargo, en esta misma especie se ha descrito un efecto potenciador de la  $T_3$  sobre la producción de  $E_2$  estimulada por gonadotropinas (Cyr y Eales, 1988), si bien cuando los niveles de  $T_3$  exceden los fisiológicos su acción sobre la función ovárica se torna inhibitoria.

En conclusión, el desplazamiento que se observa de los perfiles estacionales de actividad gonadal y tiroidea parece que podría explicarse parcialmente en base a las interacciones de estos dos ejes neuroendocrinos, de manera que durante los estados finales

del desarrollo ovárico los niveles relativamente altos de  $T_3$  estimularían la maduración ovocítica y cuando la  $T_3$  alcanza valores máximos (Julio) podría participar en el descenso de los niveles de  $E_2$  que a su vez favorecerían el posterior descenso de los niveles plasmáticos de HT.

#### 4. REGULACIÓN AMBIENTAL DE LA ACTIVIDAD TIROIDEA.

##### a) Papel del fotoperíodo.

Dada la importancia que el fotoperíodo parece tener en el control del crecimiento y metamorfosis de anfibios anuros, nos planteamos estudiar el efecto de condiciones extremas de iluminación (oscuridad y luz constantes) sobre la concentración de HT. Nuestros resultados indican una falta de efecto tanto de 24L como de 24D sobre la concentración de HT tras seis días de aclimatación, aunque se aprecia un incremento significativo de la proporción  $T_3/T_4$  en el grupo 24L tanto al mediodía como a la medianoche. Luego, posiblemente se esté produciendo un ligero incremento de la desyodación periférica y/o cambios en la secreción relativa de HT. Esta posibilidad justificaría la aceleración de la metamorfosis inducida por los fotoperíodos largos en *R. perezi* (Delgado *et al.*, 1984) y *R. pipiens* (Wright *et al.*, 1988b). También en larvas de *R. catesbeiana* mantenidas en fotoperíodos largos se ha observado un desarrollo más rápido en Septiembre, aunque al principio del verano la situación fue al contrario, indicando que la influencia del fotoperíodo sobre el desarrollo metamórfico varía estacionalmente (Crawshaw *et al.*, 1992). Por otra parte, observamos un incremento significativo de la proporción  $T_3/T_4$  en el grupo 24D al mediodía. En este mismo sentido, también se ha observado un efecto estimulador de 24D y fotoperíodos cortos sobre el desarrollo en otras especies de anuros (*D. pictus*: Delgado *et al.*, 1984; Gutiérrez *et al.*, 1984; *X. laevis*: Delgado *et al.* 1987; Edwards y Pivorun, 1991). Recientemente se ha sugerido que el grado de desarrollo no vendría determinado por la longitud del ciclo luz/oscuridad, ni por la de la fotofase o escotofase, sino más bien por la coincidencia de la fase luminosa con la fase sensible de un presunto ritmo endógeno (Wright *et al.*, 1990b).

El efecto del tratamiento 24L sobre la concentración de HT en larvas de *R. perezi* es diferente dependiendo de si se trata de un tratamiento agudo (24 h) o de una aclimatación

(crónico). Los datos disponibles no nos permiten dar una explicación simple a este hecho. Por otra parte, los tratamientos crónicos (una semana) con 24L y 24D provocan cambios muy parecidos. Debemos tener en cuenta que toda aclimatación, considerada en sentido estricto, provocaría un cambio fisiológico que tendería a restaurar las condiciones originales del organismo y por tanto, tiene que ser compensatoria aunque no se requiera que la compensación sea completa (Hochachka y Somero, 1984; Rome *et al.*, 1992). En este contexto, es posible que las condiciones extremas de iluminación a largo plazo realmente conduzcan a ligeros cambios en la 5'D (aumento de la relación  $T_3/T_4$ ) que tendrían como finalidad el restablecimiento de la situación preaclimatación, por lo que no se observarían cambios significativos en las concentraciones de HT con respecto a los controles.

Nuestros resultados en cuanto a la influencia de la luz sobre el eje tiroideo de individuos adultos de *R. perezii* parecen indicar que la ausencia de fotoperíodo, es decir las condiciones extremas de iluminación (24L y 24D), no afecta de forma significativa al patrón diario de HT plasmáticas. Tampoco se modifica significativamente el perfil tiroideo diario de la fracción unida de HT. Sin embargo, se observan ciertos cambios día/noche en el contenido tiroideo de HT libres y/o su relación, sugiriendo una posible participación de la luz en la liberación de HT. Por otra parte, en el estudio de la potencia de los efectos principales que influyen sobre los distintos parámetros tiroideos analizados en los experimentos de aclimatación térmica, se observaba que únicamente los niveles de  $T_3$  plasmática eran afectados directamente por el momento del fotociclo diario en el que los animales eran sacrificados, lo que podría estar indicando la existencia de cambios diarios en la actividad 5'D, ya que la mayor parte de la  $T_3$  plasmática procede de la monodesyodación periférica. En mamíferos roedores se han descrito ritmos diarios de la actividad 5'D tipo II con valores nocturnos superiores en la glándula pineal (Tanaka *et al.*, 1987; Jiménez *et al.*, 1993), la hipófisis (Murakami *et al.*, 1988) y la glándula de Harder (Guerrero *et al.*, 1989).

Estudios previos han sugerido un papel del fotoperíodo en la regulación del eje tiroideo de anfibios adultos, de modo que los fotoperíodos cortos, así como la oscuridad constante, inducían un incremento de la  $T_4$  plasmática en *R. ridibunda*, habiéndose observado incluso un efecto estimulador de la baja intensidad lumínica en individuos mantenidos bajo fotoperíodos cortos y a 4°C en Diciembre (Kühn *et al.*, 1990), desapareciendo dicho efecto bajo fotoperíodos largos. Como hemos comentado anteriormente, nuestros resultados parecen indicar que el fotoperíodo podría estar afectando a la liberación de HT, en consonancia con

lo sugerido por Kühn y colaboradores (1990), y/o a la desyodación periférica. Sin embargo, los experimentos realizados en la presente memoria para intentar aclarar el papel que desempeñan los factores ambientales en la regulación del eje tiroideo de *R. perezii* parecen indicar que la temperatura tiene una influencia más importante, al menos en las condiciones experimentales utilizadas en nuestro estudio.

### **b) Papel de la temperatura.**

La temperatura desempeña un papel importante en el control de muchos aspectos de la función endocrina en animales poiquiloterms. Nuestros resultados indican que el tratamiento térmico agudo (24 h) de larvas prometamórficas de *R. perezii* con temperatura baja (5-10°C) induce un descenso significativo en la concentración de  $T_4$  al mediodía. Estos datos concuerdan con trabajos previos en los que se observó que las temperaturas bajas frenan la metamorfosis y producen una depresión en la secreción de  $T_4$  en anfibios (véase Hourdry y Beaumont, 1985). Por otra parte, la temperatura alta induce un incremento en la concentración de  $T_4$  tanto al mediodía (25-30°C) como a la medianoche (30°C), estando de acuerdo con el conocido efecto acelerador que las temperaturas altas tienen sobre la metamorfosis de anfibios. La ausencia de modificaciones en la concentración de  $T_3$  tras el tratamiento podría indicar que la temperatura estaría afectando fundamentalmente a la secreción de  $T_4$ , como principal producto tiroideo, tal y como se ha demostrado en otros vertebrados poiquiloterms (Licht *et al.*, 1989). De esta forma la temperatura alta estaría induciendo un incremento en la secreción de  $T_4$  que alcanzaría valores máximos, sin afectar a la desyodación periférica, y por tanto la proporción  $T_3/T_4$  descendería con respecto al control. Por el contrario, la temperatura baja parece inducir un descenso de la secreción de  $T_4$  a niveles basales y tiende a aumentar la proporción  $T_3/T_4$ , lo que probablemente se deba a un incremento más notable de la vida media de la  $T_3$  (véase Dodd y Dodd, 1976). Otra posibilidad sería que la temperatura baja provocara una activación de la desyodación periférica principalmente nocturna, que determinaría la desaparición de los cambios día/noche. A favor de esta propuesta se ha observado que el frío induce una activación de la actividad 5'D en varios tejidos de mamíferos roedores (Scammell *et al.*, 1981; Silva y Larsen, 1983; Guerrero *et al.*, 1990).

Es interesante destacar que mientras que el grupo control mostró diferencias día/noche tanto en  $T_3$  como en  $T_4$ , con valores inferiores a la medianoche, el grupo tratado con calor sólo presentó este tipo de variaciones en la concentración de  $T_3$  y el grupo tratado con frío

no presentó variaciones diarias en ningún caso, luego la temperatura, y concretamente los termociclos diarios (temperaturas normalmente más elevadas durante el día), podrían desempeñar un papel en la regulación de los ciclos diarios de actividad tiroidea en larvas de anuros. No obstante, otros factores endógenos y/o exógenos deben estar implicados, puesto que los controles, que se mantuvieron a una temperatura constante (20°C), presentaron cambios día/noche en la concentración de HT.

Con relación al efecto crónico de la temperatura sobre los cambios diarios de HT en adultos de *R. perezi*, resulta interesante destacar que, en verano, el grupo aclimatado a 5°C es el único que presenta cambios día/noche en varios parámetros tiroideos, observándose diferencias respecto al grupo aclimatado a 25°C. Estas diferencias son debidas a la temperatura de aclimatación *per se* en los casos de la proporción  $T_3/T_4$  plasmática y de la  $FT_3$ , o debidas a la interacción de este factor con la estación del año y el fotociclo diario en el caso de la  $BT_4$ . De manera similar en invierno el grupo aclimatado a 25°C presenta variaciones en el patrón diario de  $T_3$  plasmática. El hecho de que bajo las mismas condiciones de temperatura y fotoperíodo un mismo grupo de aclimatación presente patrones diarios de HT diferentes dependiendo de la estación indicaría que estas fluctuaciones diarias reflejan la existencia de un verdadero ritmo endógeno. Por otra parte, en el estudio estacional de los ciclos diarios los animales estaban en condiciones naturales de temperatura y por tanto sometidos a fluctuaciones diarias de la misma (temperaturas nocturnas inferiores). Los niveles plasmáticos de HT en estos animales eran más bajos durante la noche, en consonancia con el efecto de la temperatura sobre la actividad tiroidea que hemos observado tanto en larvas como en adultos. Por tanto podemos afirmar que se produce un descenso de la secreción tiroidea con la temperatura baja y un incremento de la misma inducido por la temperatura alta. En el caso de los experimentos de aclimatación térmica la temperatura, alta o baja, se mantenía constante a lo largo del fotociclo diario, de manera que en invierno el grupo aclimatado a 25°C presentaría temperaturas nocturnas anormalmente altas, siendo las diferencias menos acusadas durante el día, en verano la situación sería similar.

Parece, por tanto, que la temperatura baja estaría provocando, también en adultos, un descenso en la secreción de HT, fundamentalmente de  $T_4$ . No obstante, un aumento en la degradación de la  $T_4$  plasmática no se puede descartar, si bien existen datos que indican que las temperaturas bajas (6°C) incrementan la vida media de las HT en larvas de anuros (véase Dodd y Dodd, 1976). Por otra parte, cuando comparamos los resultados obtenidos en

los experimentos de aclimatación térmica en verano e invierno, observamos que el mismo grupo de aclimatación presenta diferencias estacionales (valores generalmente superiores en verano independientemente de la temperatura de aclimatación), lo que estaría indicando la existencia de un ritmo estacional endógeno, ya que tanto la temperatura como el fotoperíodo se mantenían constantes en las dos épocas del año. Por último, otra posibilidad a considerar es que la glándula tiroidea presente períodos refractarios a la estimulación ejercida por factores ambientales y/o endógenos, como ocurre en el caso de las gónadas (Rastogi e Iela, 1980).

### c) Papel de la alimentación.

Los resultados en cuanto a la influencia de la alimentación sobre la actividad tiroidea en larvas de *R. perezii* indican que el ayuno (una semana) induce un descenso significativo en la concentración de  $T_3$  al mediodía y a la medianoche, mientras que en el caso de la  $T_4$  sólo fue significativo a la medianoche, aunque los niveles medios diurnos también fueron inferiores a los del grupo control.

Ciertos estudios realizados en peces ponen de manifiesto que la ingesta influye de manera importante sobre la actividad del eje tiroideo. La actividad tiroidea de los salmónidos muestra marcadas respuestas tanto crónicas como agudas al alimento. Las fluctuaciones diarias de los niveles plasmáticos de  $T_4$  están determinadas por el aporte inmediato de alimento, bien de manera directa, o indirecta a través de la interacción con las condiciones fotoperiódicas. Los niveles circulantes de  $T_3$ , sin embargo, se ven menos afectados por la disponibilidad inmediata de nutrientes pero responde con más fuerza ante el estímulo alimenticio a largo plazo, al menos en parte, mediante la regulación de la actividad 5'D hepática (Eales, 1988).

Los trabajos dedicados al estudio del efecto de la alimentación en larvas de anfibios son muy limitados y se han restringido en general a la descripción de los cambios en el grado de desarrollo y crecimiento observados tras el ayuno o la ingestión de determinados alimentos (véase Kaltenbach y Hagedorn, 1981). Posteriormente, en larvas de *R. pipiens* no se ha observado un efecto del horario de alimentación sobre el desarrollo metamórfico (Wright *et al.*, 1988a).

Nuestros datos concuerdan con trabajos previos que describían un efecto depresor del ayuno sobre la metamorfosis de anuros (véase Kaltenbach y Hagedorn, 1981). Además, mientras que los controles presentaron diferencias día/noche en la concentración de  $T_4$ , con

valores nocturnos más elevados, en el grupo de ayuno se mantienen los valores bajos en los dos momentos del fotociclo diario. De manera que el ayuno en *R. perezii* desciende la concentración de HT a niveles basales, actuando sobre la secreción de HT, como ha sido previamente sugerido en vertebrados homeotermos (Groscolas y Leloup, 1989; Schröder *et al.*, 1992), probablemente a nivel hipotalámico (Blake *et al.*, 1991) y/o hipofisario (Rodríguez y Jolin, 1991, Rodríguez *et al.*, 1992), y sin afectar a la desyodación periférica (la proporción  $T_3/T_4$  no muestra diferencias con respecto a los controles en ningún caso). Sin embargo, se ha descrito una inhibición de la 5'D como consecuencia del ayuno, tanto en homeotermos (Mitchell y Raza, 1986; Aláez *et al.*, 1992) como en poiquilotermos (Shields y Eales, 1986). También debemos considerar la posibilidad de que otros ejes endocrinos que pueden interaccionar con el tiroideo se vean modificados por el ayuno. En este sentido, se ha observado que la restricción de alimento incrementa los niveles de corticosteroides (Murphy y Wideman, 1992), que a su vez podrían inducir una reducción de los niveles plasmáticos de HT (Vijayan y Leatherland, 1989), así como alteraciones en la desyodación periférica (Vijayan *et al.*, 1988).

La desaparición de las diferencias diarias en la concentración de  $T_4$  con el ayuno podría indicar que la disponibilidad de alimento es importante para la expresión de los cambios día/noche de la actividad tiroidea en larvas de *R. perezii*, induciéndonos a pensar que el incremento nocturno observado en larvas premetamórficas podría estar relacionado con una mayor actividad alimenticia durante esta fase del fotociclo diario (numerosos anuros tienden a presentar patrones nocturnos de actividad, Foster y Roberts, 1982; Sinsch, 1984). Por otra parte, debemos tener en cuenta que durante la metamorfosis la alimentación tiene una importancia vital para el desarrollo normal de las larvas. El cese de la ingestión de alimento que tiene lugar durante el clímax (véase Dodd y Dodd, 1976), podría explicar parcialmente los cambios en el perfil del ciclo diario de HT observados en el estado XV TK en el presente trabajo, debido a la proximidad de esta fase del desarrollo (XVIII-XXV TK).

La realimentación no induce cambios en la concentración de HT ni a las 2 ni a las 14 horas de producirse, manteniéndose valores de HT basales, similares a los del grupo de ayuno, con lo que no parece que haya una respuesta inmediata de la actividad tiroidea al alimento. Las HT son esenciales en numerosos procesos de desarrollo y diferenciación, concretamente en la maduración del cerebro (Gona, 1977), de modo que, debido al pronunciado descenso que se produce en la concentración de HT como consecuencia del ayuno, es posible que se haya retrasado el desarrollo del eje neuroendocrino que, por tanto,



no sería capaz de responder al estímulo alimenticio. Sin embargo, también debemos considerar la posibilidad de que, a pesar de la disponibilidad de alimento, la ingestión no se llevara a cabo.

En cuanto al efecto de la alimentación sobre el eje tiroideo de adultos de *R. perezii*, parece que no se produce una respuesta inmediata de la actividad tiroidea ante la ingestión de una única comida tras una semana de ayuno. En salmónidos se ha observado que el ayuno (3 días) anula las fluctuaciones diarias de los niveles plasmáticos de  $T_3$  y  $T_4$  (Eales *et al.*, 1981). Esta posibilidad de que la alimentación influya sobre los cambios diarios de la actividad tiroidea en adultos de *R. perezii* no parece probable, ya que incluso los animales que habían sido mantenidos en condiciones de ayuno durante una semana muestran cambios temporales de la concentración de  $T_3$  y de la relación  $T_3/T_4$  en plasma, que además no se vieron modificados significativamente tras la ingestión de alimento. De acuerdo con nuestros resultados, en *R. ridibunda*, especie que presenta una estrecha relación filogenética con *R. perezii*, tampoco se ha observado un efecto de la alimentación sobre los cambios diarios de la función tiroidea (Kühn *et al.*, 1983).

Sin embargo, observamos una tendencia al aumento de la relación  $T_3/T_4$  que se atenúa con el tiempo y que podría estar indicando una activación de la desyodación periférica, como se ha observado en otros vertebrados poiquilotermos (véase Eales, 1988). En este sentido, se ha observado un incremento en la desyodación periférica de  $T_4$  a las cuatro horas de la realimentación tras 6 días de ayuno en trucha (*S. gairdneri*, Flood y Eales, 1983). Más recientemente, se ha descrito un incremento de los niveles plasmáticos de  $T_4$ , pero no de  $T_3$ , a las dos horas de la ingestión de una única comida tras un período de 3 días de ayuno en otra especie de trucha (*Oncorhynchus mykiss*, Himick y Eales, 1990). Sin embargo, esta respuesta de la  $T_4$  plasmática sólo se observó en individuos con un determinado peso corporal que habían consumido una cantidad de comida superior al 0,38% de su peso. Por otra parte, parece que la elevación postprandial de los niveles plasmáticos de  $T_4$  se debería a una mayor secreción tiroidea de esta hormona inducida por la elevación de los niveles de glucosa en sangre (Himick y Eales, 1990). En nuestro laboratorio, hemos observado que el ayuno moderado (2 días) en *C. auratus* y el ayuno prolongado (una semana) en *Tinca tinca* provocan un descenso paralelo de los niveles plasmáticos de glucosa y de HT, que es revertido a las 4 h de la realimentación en *T. tinca* (De Pedro *et al.*, 1994b). También se ha descrito un efecto estimulador de la glucosa sobre la actividad 5'D tipo II *in vitro* (Gavin *et*

*al.*, 1990). En nuestro estudio la glucosa plasmática no se modificó significativamente tras la realimentación de una cantidad de comida equivalente al 1% del peso corporal, lo que podría explicar la falta de cambios en la concentración plasmática de  $T_4$ . Por otra parte, incluso tras 18 meses de ayuno los niveles de glucosa en plasma sólo descienden a la mitad en *R. esculenta* (véase Blier y Guderley, 1986).

Quizás esta relativa falta de efecto del estado nutricional sobre la función tiroidea de los anfibios posea un significado adaptativo, ya que los anfibios están sujetos a largos períodos de ayuno durante la hibernación y sin embargo son capaces de mantener niveles relativamente altos de HT en plasma durante este período (Kühn *et al.*, 1983, 1984b; Tasaki *et al.*, 1986), al igual que ocurre en pingüinos, aves muy bien adaptadas a períodos prolongados de ayuno en la naturaleza (Groscolas y Leloup, 1986).

Será necesario realizar más estudios para intentar aclarar si las variaciones ontogénicas, diarias y estacionales de la actividad tiroidea en anfibios están bajo la influencia de otros componentes del sistema endocrino y/o si los diferentes ritmos hormonales están regulados por las mismas señales ambientales, fundamentalmente fotoperíodo y temperatura, compartiendo algunas características en el proceso de integración.

Como hemos visto, las interrelaciones de los ejes tiroideo y gonadal son complejas. En esta Memoria hemos barajado constantemente la posibilidad de que el sistema de la MEL esté implicado en la regulación de estos dos ejes en *R. perezi*. Con anterioridad se ha observado un gran paralelismo entre las acciones de la MEL sobre las funciones gonadal y tiroidea en mamíferos (véase Vriend, 1983a,b). Recientemente se ha sugerido que una misma señal coordina la secreción pulsátil de las células gonadotrópicas y tirotrópicas de la hipófisis (Samuels *et al.*, 1990), así como la posibilidad de que un mismo mecanismo ligue las alteraciones circadianas de actividad producidas por el estradiol y el estado tiroideo (McEachron *et al.*, 1990). Los organismos multicelulares son multiosciladores, es decir poseen más de un reloj o marcapasos interno, surgiendo la necesidad de un acoplamiento de los mismos. Se ha sugerido que las áreas que están implicadas en la organización circadiana y circanual de los vertebrados son fundamentalmente tres: la glándula pineal, el núcleo supraquiasmático y los ojos (véase Underwood, 1990). También el pliegue intergeniculado, que recibe proyecciones retinales y posee proyecciones eferentes al núcleo supraquiasmático

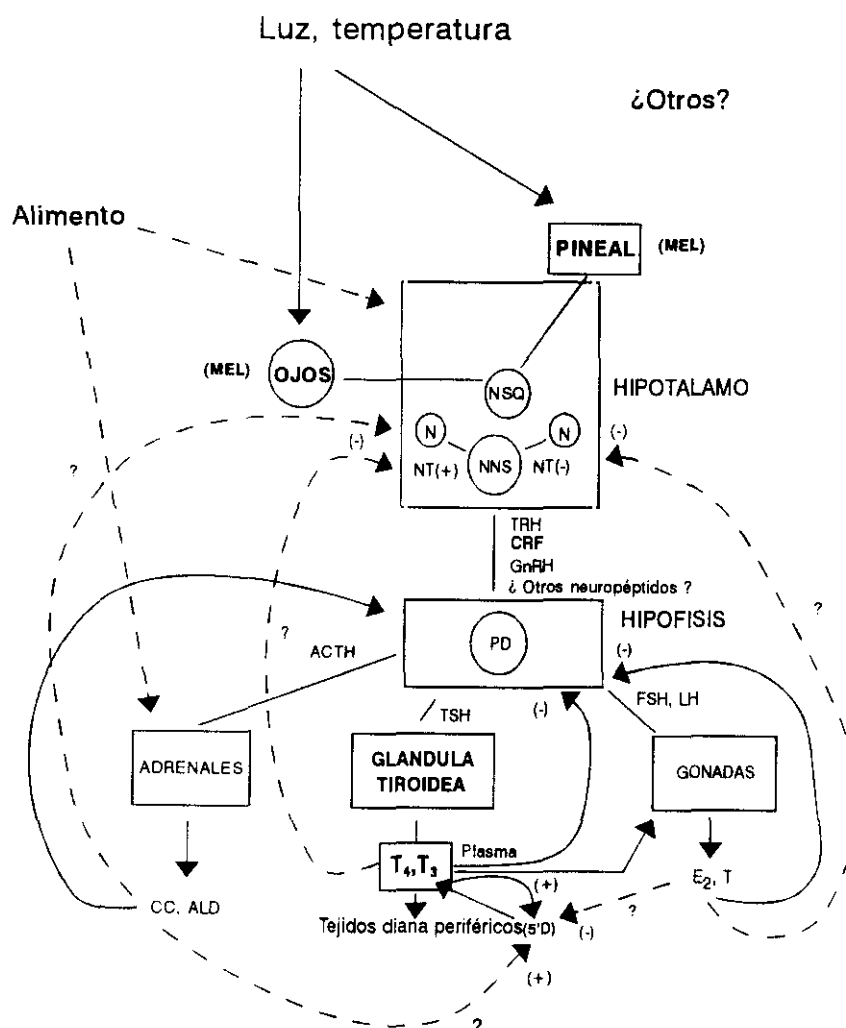
y el hipotálamo, ha sido implicado en el control de ritmos circadianos, habiéndose localizado recientemente en *R. pipiens* (Montgomery *et al.*, 1991). El ritmo diario y estacional de secreción de MEL puede ser el mecanismo por el que la glándula pineal, y posiblemente los ojos, se comunica con el resto del sistema circa, de manera que la MEL diaria teóricamente podría, no sólo sincronizar los relojes internos, sino ejercer un control de fase sobre ellos de manera que los ritmos controlados por estos relojes ocurran en el momento apropiado.

En resumidas cuentas, la glándula pineal y los ojos, a través de la MEL, parecen actuar como relojes internos, sincronizando varios ritmos para crear un orden temporal adecuado. Los glucocorticoides también parecen actuar en este sentido, pero en tanto en cuanto las glándulas adrenales en sí mismas pueden ser marcapasos ligados a la disponibilidad de alimento y a la aparición de factores estresantes de forma periódica, los glucocorticoides también pueden ejercer un considerable control independiente sobre determinados ritmos. Las hormonas tiroideas y los estrógenos parecen afectar al grado de acoplamiento entre los distintos osciladores, aunque en direcciones opuestas (McEachron y Schull, 1993).

Por otra parte, la actividad del sistema neuronal del CRF en mamíferos, que controla las respuestas endocrinas al stress (véase Owens y Nemeroff, 1991), es muy sensible a variaciones del medio ambiente (Rivier y Plotsky, 1986). Por ejemplo, se ha demostrado que la estimulación luminosa produce una liberación de CRF, como lo indica su desaparición de la eminencia media (véase Feldman y Weidenfeld, 1993). Esta respuesta es un ejemplo importante de la transducción que el sistema neuroendocrino realiza de la información ambiental externa en una respuesta fisiológica. Como ya hemos citado con anterioridad, la MEL, tanto de origen pineal como ocular, es fundamentalmente un mensajero químico que integra la información ambiental regulando funciones cíclicas en los vertebrados (Reiter, 1991c). Uno de los precursores en la síntesis de MEL es la serotonina (5-HT), que está implicada probablemente en la regulación de la producción rítmica de MEL ocular en *R. perezi* (Delgado *et al.*, 1993; Alonso-Gómez *et al.*, 1993). Existen bastantes evidencias que ponen de manifiesto la existencia de interacciones, de importancia en los procesos adaptativos, entre los sistemas serotoninérgicos centrales y el eje adenohipofisario en mamíferos (véase Chaouloff, 1993), de forma que se ha demostrado, por ejemplo, que agonistas de la 5-HT inducen incrementos en la liberación de ACTH hipofisaria inducida por CRF *in vitro* (Calogero *et al.*, 1993) y que la activación de los receptores hipotalámicos de serotonina del tipo 5-HT<sub>1A</sub> induce liberación de CRF (Pan y Gilbert, 1992). En conclusión,

existe la posibilidad de que en anfibios, larvarios y adultos, los sistemas del CRF y de la MEL estén implicados conjuntamente en la transducción de la información ambiental y/o endógena en una respuesta endocrina que sincronizaría la fisiología del animal con el medio externo.

En resumen, la actividad tiroidea de *R. perezii* presenta cambios diarios, que surgen en la premetamorfosis, y cambios estacionales. La regulación endógena del eje tiroideo cambia con la transformación de la larva en adulto, incluyendo las interacciones con otros ejes neuroendocrinos, si bien la influencia de los distintos factores ambientales parece ser similar. En el siguiente esquema hemos tratado de representar de una manera simplificada el funcionamiento del eje tiroideo propuesto en larvas y adultos de *R. perezii*.



NSQ, núcleo supraquiasmático; N, neuronas; NNS, neuronas neurosecretoras, NT, neurotransmisores, PD, *pars distalis*; CC, corticosterona; ALD, aldosterona. Las flechas discontinuas indican procesos hipotéticos (?) en *Rana perezii*. (+): influencias estimuladoras; (-): influencias inhibitoras.

## **VI. CONCLUSIONES**

- La evolución del contenido total de hormonas tiroideas a lo largo de la ontogenia de *R. perezii* es similar a la descrita fundamentalmente en plasma de otras especies de anuros mostrando valores crecientes según se aproxima el clímax metamórfico acompañados de un incremento en la desyodación periférica. Existen hormonas tiroideas en estados embrionarios que podrían ser de origen materno. Además, en base a los cambios que experimenta el tamaño corporal a lo largo del desarrollo, es fundamental en este tipo de estudios analizar la evolución tanto de la concentración como del contenido total de hormonas tiroideas.
- La actividad tiroidea en larvas de *R. perezii* muestra un perfil rítmico desde la fase de premetamorfosis, aunque con anterioridad podrían producirse cambios día/noche en la utilización y/o degradación de hormonas tiroideas. Los ritmos día/noche de hormonas tiroideas en larvas de *R. perezii* podrían estar sincronizados por factores ambientales (temperatura y comida) y/o endógenos (esteroides gonadales) que podrían ser integrados por el sistema de la melatonina.
- El CRF desempeña un papel clave en la regulación del eje tiroideo durante la prometamorfosis de *R. perezii*, actuando probablemente a nivel hipofisario estimulando la liberación de TSH.
- La melatonina nocturna es necesaria para la expresión del patrón diario de hormonas tiroideas y, además, podría tener un efecto estimulador sobre la actividad tiroidea y gonadal durante la metamorfosis de *R. perezii*, mientras que la naturaleza de sus acciones podría verse modificada en el adulto. Así, la melatonina podría ejercer una acción antitirotrópica en individuos adultos de *R. perezii* dependiendo de la estación y del estado gonadal de los animales. Al igual que en las larvas, parece ser necesaria como indicador de la fase oscura del fotociclo diario, para el funcionamiento normal del eje tiroideo. Probablemente la melatonina actúa sobre la actividad tiroidea afectando a la secreción y/o metabolismo de las hormonas tiroideas.
- Los esteroides gonadales ejercen una acción inhibidora sobre la actividad tiroidea de larvas prometamórficas de *R. perezii*, pudiendo estar este efecto mediado por cambios en los niveles de melatonina. A su vez, el desarrollo gonadal parece ser estimulado por la actividad

tiroidea, concretamente por la  $T_3$ , apoyando el papel predominante de esta hormona frente a la  $T_4$ , y por tanto la importancia de la desyodación periférica en la determinación de los sucesos metamórficos.

- En individuos adultos de *R. perezii* existe un ritmo diario de la actividad tiroidea que además muestra perfiles diferentes dependiendo de la estación anual, lo que podría sugerir cambios estacionales en el perfil diario de la producción de TSH. Asimismo, el momento del fotociclo diario afecta directamente a los niveles plasmáticos de  $T_3$ , indicando cambios en la desyodación periférica. La interacción de fotoperíodo y temperatura podría estar influyendo sobre los cambios estacionales de la actividad tiroidea diaria en adultos de *R. perezii*. La disponibilidad de alimento no parece ser importante en la determinación de los ciclos diarios de actividad tiroidea. Existe un ritmo estacional de la actividad tiroidea en machos y hembras de *R. perezii*, que además presenta diferencias sexuales, fundamentalmente durante el período primavera-verano cuando la actividad tiroidea es máxima, y que afectan al patrón de secreción de la glándula.

- El perfil estacional de actividad tiroidea en individuos adultos de *R. perezii* parece superponerse al desarrollo gonadal estacional, con un ligero desplazamiento en el tiempo, que podría explicarse parcialmente en base a las interacciones de estos dos ejes neuroendocrinos.

- La acción de los estrógenos sobre la actividad tiroidea de hembras de *R. perezii* parece producirse a nivel central, en base a los resultados obtenidos en los experimentos *in vitro*, aunque un efecto periférico afectando al metabolismo de las hormonas tiroideas no puede descartarse. Por el contrario, el efecto de las hormonas tiroideas sobre la actividad gonadal de hembras de *R. perezii* se produce, al menos en parte, de forma directa a nivel ovárico.

- La regulación ambiental del eje tiroideo en *R. perezii* es similar en larvas y adultos. Las condiciones extremas de iluminación parecen afectar a la secreción y/o desyodación de hormonas tiroideas, aunque la temperatura ejerce un efecto más importante sobre la actividad tiroidea afectando fundamentalmente a la secreción de  $T_4$ . En cuanto al alimento no se produce una respuesta inmediata de la actividad tiroidea al estímulo alimenticio.

## **VII. BIBLIOGRAFÍA**



- ADKINS-REGAN, E. (1987). Hormones and sexual differentiation. En: "Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles". D.O. Norris, E. Jones (eds.). Plenum Press, New York/London. Cap. 1, pp. 1-29.
- ADLER, K. (1976). Extraocular photoreception in amphibians. *Photochem. Photobiol.* **23**: 275-298.
- AGHA, A.K. y JOY, K.P. (1987). Effect of pinealectomy on thyroidal  $^{131}\text{I}$  uptake during different phases of gonadal cycle of the indian catfish *Heteropneustes fossilis* (Bloch). *Indian J. Exp. Biol.* **25**: 228-229.
- AHLERSOVÁ, E., AHLERS, I. y TOROPILA, M. (1986). Circadian oscillations of thyroid hormones and insulin in the serum of fasting rats. *Physiol. bohemoslov.* **35**: 233-241.
- ALÁEZ, C., CALVO, R., OBREGÓN, M.J. y PASCUAL-LEONE, A.M. (1992). Thyroid hormones and 5'-deiodinase activity in neonatal undernourished rats. *Endocrinology* **130**: 773-779.
- ALBERCH, P., GALE, E.A. y LARSEN, P.R. (1986). Plasma  $\text{T}_4$  and  $\text{T}_3$  levels in naturally metamorphosing *Eurycea bislineata* (Amphibia; Plethodontidae). *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**: 153-163.
- ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1983). Effects of prolactin and bromocriptine in *Discoglossus pictus* (Anuran Amphibian) tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol.* **74A**: 765-772.
- ALONSO-BEDATE, M., LÓPEZ-GORDO, J.L. y CALLE, C. (1974). Control endocrino de la maduración del ovocito de *Rana ridibunda*. *Bol. Real Soc. Esp. Hist. Nat.* **70**: 3-9.
- ALONSO-BEDATE, M., FRAILE, A., SÁEZ, M.J. y CUELLAR, A. (1976). Ultraestructura, función y regulación del oviducto de *Rana ridibunda*. *Reproducción* **3**: 73-83.
- ALONSO-BEDATE, M., DELGADO, M.J., NAVA, M.P. y GUTIÉRREZ, P. (1985). Further studies on morphogenesis, growth and regeneration in *Discoglossus pictus pictus* (Otth.) tadpoles immersed in a melatonin solution. *Acta Embryol. Morphol. Exper.* **6**: 167-175.
- ALONSO-BEDATE, M., DELGADO, M.J. y CARBALLADA, M.R. (1988). *In vivo* effect of melatonin and gonadotropin-releasing hormone (GnRH) on testicular function in *Rana temporaria*. *J. Pineal Res.* **5**: 323-332.
- ALONSO-BEDATE, M., CARBALLADA, R. y DELGADO, M.J. (1990). Effects of melatonin on gonadal steroids and glucose plasma levels in frogs (*Rana perezi* and *Rana temporaria*). *J. Pineal Res.* **8**: 79-89.

ALONSO-GÓMEZ, A.L., TEJERA, M., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1990). Response to pinealectomy and blinding in vitellogenic female frogs (*Rana perezii*) subjected to high temperature in autumn. *Can. J. Physiol. Pharmacol.* **68**: 94-98.

ALONSO-GÓMEZ, A.L., ALONSO-BEDATE, M. y DELGADO, M.J. (1993). The inhibition by indoleamines (tryptamine and serotonin) of ocular serotonin-*N*-acetyltransferase from *Rana perezii* is temperature dependent. *Neurosci. Lett.* **155**: 33-36.

ALONSO-GÓMEZ, A.L., De PEDRO, N., GANCEDO, B., ALONSO-BEDATE, M., VALENCIANO, A.I. y DELGADO, M.J. (1994). Ontogeny of ocular serotonin *N*-acetyltransferase activity daily rhythm in four anuran species. *Gen. Comp. Endocrinol.* **94**: 357-365.

ANDERSON, S.L. y DENT, J.N. (1982). Effects of TRH, TSH, and prolactin on the release *in vitro* of thyroxine from thyroid glands of the red-spotted newt. *Gen. Comp. Endocrinol.* **47**: 280-287.

ANDO, M. y HAMMERSCHLAG, R. (1989). Premetamorphic effects of thyroid hormones on tadpole sensory ganglia. *Int. J. Dev. Neurosci.* **7**: 633-639.

ANDO, M., NAGATA, Y. y HAMMERSCHLAG, R. (1991). Time course of plasma T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> levels and tissue transglutaminase activity following injection of thyroid hormones in tadpoles. *Zool. Sci.* **8**: 721-727.

ARAI, T. y WAKAHARA, m. (1993). Hemoglobin transition from larval to adult types in normally metamorphosing, metamorphosed and metamorphosed-arrested *Hynobius retardatus*. *Zool. Sci.* **10**: 637-644.

AVERYHART-FULLARD, V. y JAFFE, R.C. (1990). Cloning and thyroid hormone regulation of albumin mRNA in *Rana catesbeiana* tadpole liver. *Mol. Endocrinol.* **4**: 1556-1563.

BABIN, P.J. (1992). Binding of thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine to trout plasma lipoproteins. *Am. J. Physiol.* **262** (*Endocrinol. Metab.* **25**): E712-E720.

BAGNARA, J.T. (1963). The pineal and the body lightening reaction of larval amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **3**: 86-100.

BAKER, B.S. y TATA, J.R. (1992). Prolactin prevents the autoinduction of thyroid hormone receptor mRNAs during amphibian metamorphosis. *Dev. Biol.* **149**: 463-467.

BAKER, P.C. (1969). Melatonin levels in developing *Xenopus laevis*. *Comp. Biochem. Physiol.* **28**: 1387-1393.

BAKER, P.C. y HOFF, K.M. (1971). Melatonin localization in the eyes of larval *Xenopus*. *Comp. Biochem. Physiol.* **39A**: 879-881.

- BALLS, M., CLOTHIER, R.H., ROWLES, J.M., KITELEY, N.A. y BENNETT, G.W. (1985). TRH distribution, levels, and significance during the development of *Xenopus laevis*. En: "Metamorphosis". M. Balls, M. Bownes (eds.). Clarendon Press, Oxford. pp. 260-272.
- BANDYOPADHYAY, S., BANERJEE, P.P. y BHATTACHARYA, S. (1991). 17 $\beta$ -estradiol releases thyroxine from the thyroid follicles of a teleost, *Channa gachua* (Ham.). *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**: 227-233.
- BARRINGTON, E.J.W. y THORPE, A. (1965). The identification of monoiodotyrosine, diiodotyrosine and thyroxine in extracts of the endostyle of the ascidian, *Ciona intestinalis* L. *Proc. R. Soc. London, Ser. B* **163**: 136-149.
- BEGAY, V., VALOTAIRE, Y., RAVAUULT, J.P., COLLIN, J.P. y FALCON, J. (1994). Detection of estrogen receptor mRNA in trout pineal and retina: estradiol-17 $\beta$  modulates melatonin production by cultured pineal photoreceptor cells. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**: 61-69.
- BERNIER-VALENTIN, F., KOSTROUCH, Z., RABILLOUD, R., MUNARI-SILEM, Y. y ROUSSET, B. (1990). Coated vesicles from thyroid cells carry iodinated thyroglobulin. First indication for an internalization of the thyroid prohormone via a mechanism of receptor-mediated endocytosis. *J. Biol. Chem.* **265**: 17373-17380.
- BERRY, M.J. y LARSEN, P.R. (1992). The molecular cloning of type I iodothyronine deiodinase: new insights into thyroid hormone action. *Thyroid Today* **14**: 1-9.
- BETLEY, S., PEAK, M. y AGIUS, L. (1993). Triiodo-L-thyronine stimulates glycogen synthesis in rat hepatocyte cultures. *Mol. Cell. Biochem.* **120**: 151-158.
- BINKLEY, S. (1981). Pineal biochemistry: Comparative aspects and circadian rhythms. En: "The Pineal Gland, Anatomy and Biochemistry". R.J. Reiter (ed.). CRC Press, Boca Raton, FL., Vol. 1, pp. 155-172.
- BLAKE, N.G., ECKLAND, D.J.A., FOSTER, O.J.F. y LIGHTMAN, S.L. (1991). Inhibition of hypothalamic thyrotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid during food deprivation. *Endocrinology* **129**: 2714-2718.
- BLIER, P. y GUDERLEY, H. (1986). The enzymatic and metabolic effects of extended food deprivation in *Rana pipiens*. *Physiol. Zool.* **59**: 230-239.
- BONA-GALLO, A., LICHT, P., MACKENZIE, D.S. y LOFTS, B. (1980). Annual cycles in levels of pituitary and plasma gonadotropin, gonadal steroids, and thyroid activity in the chinese cobra (*Naja naja*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **42**: 477-493.
- BRAY, T. y SICARD, R.E. (1982). Correlation among the changes in the levels of thyroid hormones, thyrotropin, and thyrotropin-releasing hormone during the development of *Xenopus laevis*. *Exp. Cell. Biol.* **50**: 101-107.

BRES, O. y EALES, J.G. (1988). High-affinity, limited-capacity triiodothyronine-binding sites in nuclei from various tissues of the rainbow trout (*Salmo gairdneri*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 71-79.

BRES, O. y EALES, J.G. (1990). Saturable triiodothyronine-binding sites in the pituitary nuclei of salmonid teleost fish. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**: 23-28.

BRES, O. y NICOLL, C.S. (1993). Effects of prolactin, growth hormone, and triiodothyronine on prolactin receptors in larval and adult tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *J. Exp. Zool.* **266**: 290-298.

BROQUA, P., LAUDE, D., BLUET-PAJOT, M.T., SCHMIDT, B., BAUDRIE, V. y CHAOULOFF, F. (1993). Are 5-HT<sub>1A</sub> autoreceptors involved in the inhibitory effect of ipsapirone on cold-elicited thyrotropin secretion?. *Neuroendocrinology* **57**: 640-647.

BROWN, C.L. (1988). Photoperiod effects on thyroid function in fish. En: "Processing of Environmental Information in Vertebrates". M.H. Stetson (ed.). Springer-Verlag, Inc., New York. Cap. 1, pp. 1-17.

BROWN, P.S., BARRY, B. y BROWN, S.C. (1988). Changes in absolute and proportional water content during growth and metamorphosis of *Rana sylvatica*. *Comp. Biochem. Physiol.* **91A**: 189-194.

BROWN, S.B., MacLATCHY, D.L., HARA, T.J. y EALES, J.G. (1991). Effects of cortisol on aspects of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine metabolism in rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**: 207-216.

BUBENIK, G.A. y BROWN, R.D. (1989). Seasonal levels of cortisol, triiodothyronine and thyroxine in male axis deer. *Comp. Biochem. Physiol.* **92A**: 499-503.

BULANT, M., RICHTER, K., KUCHLER, K. y KREIL, G. (1992). A cDNA from brain of *Xenopus laevis* coding for a new precursor of thyrotropin-releasing hormone. *FEBS Lett.* **296**: 292-296.

BURGGREN, W.W. y JUST, J.J. (1992). Developmental changes in physiological systems. En: "Environmental Physiology of the Amphibians". M.E. Feder, W.W. Burggren (eds.). The University of Chicago Press, Chicago/London. Cap. 16, pp. 467-530.

BURNS, J.T., PATYNA, R. y RYLAND, S. (1987). A circadian rhythm in the effect of thyroxine in the stimulation of metamorphosis in the African clawed frog, *Xenopus laevis*. *J. Interdiscip. Cycle Res.* **18**: 293-296.

BURÓN, M.I. y NAVAS, P. (1988). Thyroxine specifically stimulates anuran larvae epidermal sodium pump during metamorphosis. *Comp. Biochem. Physiol.* **91A**: 693-695.

BUSCAGLIA, M. y LELOUP, J. (1980). Thyroid hormone secretion during metamorphosis in *Xenopus* genus. *Gen. Comp. Endocrinol.* **40**: 369.

BUSCAGLIA, M., LELOUP, J. y de LUZE, A. (1985). The role and regulation of monodeiodination of thyroxine to 3,5,3'-triiodothyronine during amphibian metamorphosis. En: "Metamorphosis". M. Balls, M. Bownes (eds.). Clarendon Press, Oxford. Cap. 15, pp. 273-293.

BYAMUNGU, N., CORNEILLIE, S., MOL, K., DARRAS, V. y KÜHN, E.R. (1990). Stimulation of thyroid function by several pituitary hormones results in an increase in plasma thyroxine and reverse triiodothyronine in tilapia (*Tilapia nilotica*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**: 33-40.

BYAMUNGU, N., MOL, K. y KÜHN, E.R. (1992). Evidence for the kidney as an important source of 5'-monodeiodination activity and stimulation by somatostatin in *Oreochromis niloticus* L. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**: 199-208.

BYRNE, J.J. y WHITE, R.J. (1975). Cyclic changes in liver and muscle glycogen tissue lipid and blood glucose in a naturally occurring population of *Rana catesbeiana*. *Comp. Biochem. Physiol.* **50A**: 709-715.

CACICEDO, L., De los FRAILES, M.T., LORENZO, M.J. y SANCHEZ-FRANCO, F. (1993). Pituitary and peripheral Insulin-like Growth Factor-I regulation by thyroid hormone. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 287-290.

CAHILL, G.M., GRACE, M.S. y BESHARSE, J.C. (1991). Rhythmic regulation of retinal melatonin: metabolic pathways, neurochemical mechanisms, and the ocular circadian clock. *Cell. Mol. Neurobiol.* **11**: 529-560.

CALLARD, G.V. (1983). Androgen and estrogen action in the vertebrate brain. *Amer. Zool.* **23**: 607-620.

CALOGERO, A.E., BAGDY, G., MONCADA, M.L. y D'AGATA, R. (1993). Effect of selective serotonin agonists on basal, corticotrophin-releasing hormone- and vasopressin-induced ACTH release *in vitro* from rat pituitary cells. *J. Endocrinol.* **136**: 381-387.

CARAYON, P. y AMR, S. (1989). Mechanisms of thyroid regulation. En: "Endocrinology". L.J. DeGroot (ed.). W.B. Saunders Company, Philadelphia. 2ª Ed., Vol. 1, pp. 530-540.

CARNEVALI, O., MOSCONI, G., YAMAMOTO, K., KOBAYASHI, T., KIKUYAMA, S. y POLZONETTI-MAGNI, A.M. (1992). Hormonal control of *in vitro* vitellogenin synthesis in *Rana esculenta* liver: effects of mammalian and amphibian growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**: 406-414.

CARNEVALI, O., MOSCONI, G., YAMAMOTO, K., KOBAYASHI, T., KIKUYAMA, S. y POLZONETTI-MAGNI, A.M. (1993). *In-vitro* effects of mammalian and amphibian prolactins on hepatic vitellogenin synthesis in *Rana esculenta*. *J. Endocrinol.* **137**: 383-389.

CARR, J.A. y NORRIS, D.O. (1990). Immunohistochemical localization of corticotropin-releasing factor- and arginine vasotocin-like immunoreactivities in the brain and pituitary of

the american bullfrog (*Rana catesbeiana*) during development and metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **78**: 180-188.

CASTAÑO, J.P., RAMÍREZ, J.L., MALAGÓN, M.M. y GRACIA-NAVARRO, F. (1992). Differential response of amphibian PRL and TSH pituitary cells to *in vitro* TRH treatment. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**: 178-187.

CEUSTERS, R., DARRAS, V.M. y KÜHN, E.R. (1978). Difference in thyroid function between male and female frogs (*Rana temporaria* L.) with increasing temperature. *Gen. Comp. Endocrinol.* **36**: 598-603.

CHAKRABORTI, P. y BHATTACHARYA, S. (1984). Plasma thyroxine levels in freshwater perch: influence of season, gonadotropins, and gonadal hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**: 179-186.

CHAKRABORTI, P., MAITRA, G. y BHATTACHARYA, S. (1986). Binding of thyroid hormone to isolated ovarian nuclei from a freshwater perch, *Anabas testudineus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **62**: 239-246.

CHANDOLA, A. y BHATT, D. (1982). Tri-iodothyronine fails to mimic gonado-inhibitory action of thyroxine in spotted munia: Effects of injections at different times of the day. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**: 499-503.

CHAOULOFF, F. (1993). Physiopharmacological interactions between stress hormones and central serotonergic systems. *Brain Res. Rev.* **18**: 1-32.

CHIU, K.W. y TONG, W.C.M. (1979). Effects of temperature acclimation and thyroxine injection on glycogen storage and oxygen consumption in the frog, *Rana tigrina*. *Comp. Biochem. Physiol.* **63A**: 551-553.

CHOW, N.Y., YEN-CHOW, Y.C. y WOODBURY, D.M. (1982). Effects of thyrotropin, acetazolamide, 4-acetamido-4'-isothiocyanostilbene-2, 2'-disulfonic acid, perchlorate, and ouabain on the distribution of iodide ion in cells and luminal fluid of turtle thyroid. *Endocrinology* **110**: 121-125.

CODY, V. (1984). Thyroglobulin and thyroid hormone synthesis. *Endocrine Res.* **10**: 73-88.

COLLIN, J.P., ARENDT, J. y GERN, W.A. (1988). Le "troisième oeil". *La Recherche* **203**: 1154-1165.

COOK, R.F. y EALES, J.G. (1987). Effects of feeding and photocycle on diel changes in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* **242**: 161-169.

CORPAS, I., GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1991). Food intake inhibition and metamorphosis stimulation by sheep

corticotropin-releasing hormone (CRF) administration in *Rana perezi*. *Belg. J. Zool.* **121**: 132-133.

CRAWSHAW, L.I., RAUSCH, R.N., WOLLMUTH, L.P. y BAUER, E.J. (1992). Seasonal rhythms of development and temperature selection in larval bullfrogs, *Rana catesbeiana* Shaw. *Physiol. Zool.* **65**: 346-359.

CREIGHTON, J.A. y RUDEEN, P.K. (1989). Effects of melatonin and thyroxine treatment on reproductive organs and thyroid hormone levels in male hamsters. *J. Pineal Res.* **6**: 317-323.

CYR, D.G. y EALES, J.G. (1988). Influence of thyroidal status on ovarian function in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *J. Exp. Zool.* **248**: 81-87.

CYR, D.G., MacLATCHY, D.L. y EALES, J.G. (1988). The influence of short-term 17 $\beta$ -estradiol treatment on plasma T<sub>3</sub> levels and *in vitro* hepatic T<sub>4</sub> 5'-monodeiodinase activity in immature rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 431-438.

DAINTON, B.H. (1988). Cold tolerance and thyroid activity in developing tadpoles of *Xenopus laevis*. *J. Herpetol.* **22**: 301-306.

DAINTON, B.H. (1991). Heat tolerance and thyroid activity in developing tadpoles and juvenile adults of *Xenopus laevis* (Daudin). *J. therm. Biol.* **16**: 273-276.

DANFORTH Jr., E. y BURGER, A.G. (1989). The impact of nutrition on thyroid hormone physiology and action. *Annu. Rev. Nutr.* **9**: 201-227.

DARLING, D.S., DICKHOFF, W.W. y GORBMAN, A. (1982). Comparison of thyroid hormone binding to hepatic nuclei of a rat and a teleost (*Oncorhynchus kisutch*). *Endocrinology* **111**: 1936-1943.

DARRAS, V.M. y KÜHN, E.R. (1982). Increased plasma levels of thyroid hormones in a frog *Rana ridibunda* following intravenous administration of TRH. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**: 469-475.

DARRAS, V.M. y KÜHN, E.R. (1983). Effects of TRH, bovine TSH, and pituitary extracts on thyroidal T<sub>4</sub> release in *Ambystoma mexicanum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **51**: 286-291.

DARRAS, V.M. y KÜHN, E.R. (1984). Difference on the *in vivo* responsiveness to thyrotropin stimulation between the neotenic and metamorphosed axolotl, *Ambystoma mexicanum*: Failure of prolactin to block the thyrotropin-induced thyroxine release. *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**: 321-325.

DAUNCEY, M.J. (1990). Thyroid hormones and thermogenesis. *Proc. Nutr. Soc.* **49**: 203-215.

De JESUS, E.G.T. y HIRANO, T. (1992). Changes in whole body concentrations of cortisol, thyroid hormones, and sex steroids during early development of the chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 55-61.

De LUZE, A. y LELOUP, J. (1984). Fish growth hormone enhances peripheral conversion of thyroxine to triiodothyronine in the eel (*Anguilla anguilla* L). *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**: 308-312.

De LUZE, A., LELOUP, J. y OLIVERAU, M. (1984). Effects of ovine prolactin on iodide metabolism and thyroid activity in the eel. *J. Comp. Endocrinol.* **B154**: 199-205.

De LUZE, A., LELOUP, J., PAPKOFF, H., KIKUYAMA, S. y KAWAUCHI, H. (1989). Effects of vertebrate prolactins and growth hormones on thyroxine 5'-monodeiodination in the eel (*Anguilla anguilla*): A potential bioassay for growth hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**: 186-193.

De LUZE, A., SACHS, L. y DEMENEIX, B. (1993). Thyroid hormone-dependent transcriptional regulation of exogenous genes transferred into *Xenopus* tadpole muscle *in vivo*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 7322-7326.

De PEDRO, N., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GANCEDO, B., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1993). Role of corticotropin-releasing factor (CRF) as a food intake regulator in goldfish. *Physiol. Behav.* **53**: 517-520.

De PEDRO, N., GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1994a) Alterations in food intake and thyroid hormones by CRF in the teleost fish *Tinca tinca*. *Can. J. Zool.* (en prensa).

De PEDRO, N., GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1994b) CRF effects on thyroid function is not mediated by feeding behavior in goldfish. *Pharmacol. Biochem. Behav.* (en prensa).

De VLAMING, V.L., SAGE, M. y CHARLTON, C.G. (1974). The effects of melatonin treatment on gonosomatic index in the teleost *Fundulus similis*, and the frog, *Hyla cinerea*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **22**: 433-438.

DECUYPERE, E. y KÜHN, E.R. (1988). Thyroid hormone physiology in galliformes: age and strain related changes in physiological control. *Amer. Zool.* **28**: 401-415.

DECUYPERE, E., SCANES, C.G. y KÜHN, E.R. (1983). Effects of glucocorticoids on circulating concentrations of thyroxine (T<sub>4</sub>) and triiodothyronine (T<sub>3</sub>) and on peripheral monodeiodination in pre- and post-hatching chickens. *Horm. metabol. Res.* **15**: 233-236.

DELGADO, M.J. y VIVIEN-ROELS, B. (1989). Effect of environmental temperature and photoperiod on the melatonin levels in the pineal, lateral eye, and plasma of the frog, *Rana perezi*: importance of ocular melatonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **75**: 46-53.



- DELGADO, M.J., GUTIÉRREZ, P. y ALONSO-BEDATE, M. (1983). Effects of daily melatonin injections on the photoperiodic gonadal response of the female frog *Rana ridibunda*. *Comp. Biochem. Physiol.* **76A**: 389-392.
- DELGADO, M.J., GUTIÉRREZ, P. y ALONSO-BEDATE, M. (1984). Growth response of premetamorphic *Rana ridibunda* and *Discoglossus pictus* tadpoles to melatonin injections and photoperiod. *Acta Embryol. Morphol. Exper.* **5**: 23-39.
- DELGADO, M.J., GUTIÉRREZ, P. y ALONSO-BEDATE, M. (1987). Melatonin and photoperiod alter growth and larval development in *Xenopus laevis* tadpoles. *Comp. Biochem. Physiol.* **86A**: 417-421.
- DELGADO, M.J., GUTIÉRREZ, P. y ALONSO-BEDATE, M. (1989). Seasonal cycles in testicular activity in the frog, *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**: 1-11.
- DELGADO, M.J., GUTIÉRREZ, P. y ALONSO-BEDATE, M. (1990). Annual ovarian cycle and plasma levels of 17 $\beta$ -Estradiol in the frog *Rana perezi*. *Physiol. Zool.* **63**: 373-387.
- DELGADO, M.J., ALONSO-GÓMEZ, A.L., GANCEDO, B., De PEDRO, N., VALENCIANO, A.I. y ALONSO-BEDATE, M. (1993). Serotonin N-acetyltransferase (NAT) activity and melatonin levels in the frog retina are not correlated during the seasonal cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **92**: 143-150.
- DENT, J. (1986). The Thyroid Gland. En: "Vertebrate Endocrinology: Fundamentals and Biomedical Implications". P.K.T. Pang, M.P. Schreibman (eds.). Academic Press, Inc., New York. Vol. 1, pp. 175-206.
- DENT, J.M. (1988). Hormonal interaction in amphibian metamorphosis. *Amer. Zool.* **28**: 297-308.
- DENVER, R.J. (1988). Several hypothalamic peptides stimulate *in vitro* thyrotropin secretion by pituitaries of anuran amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **72**: 383-393.
- DENVER, R.J. (1993). Acceleration of anuran amphibian metamorphosis by corticotropin-releasing hormone-like peptides. *Gen. Comp. Endocrinol.* **91**: 38-51.
- DENVER, R.J. y LICHT, P. (1988a). Thyroid status influences *in vitro* thyrotropin and growth hormone responses to thyrotropin-releasing hormone by pituitary glands of hatchling slider turtles (*Pseudemys scripta*). *J. Exp. Zool.* **246**: 293-304.
- DENVER, R.J. y LICHT, P. (1988b). Thyroid hormones act at the level of the pituitary to regulate thyrotropin and growth hormone secretion in hatchling slider turtles, *Pseudemys scripta elegans*. *J. Exp. Zool.* **247**: 146-154.
- DENVER, R.J. y LICHT, P. (1989a). Neuropeptides influencing *in vitro* pituitary hormone secretion in hatchling turtles. *J. Exp. Zool.* **251**: 306-315.

DENVER, R.J. y LICHT, P. (1989b). Neuropeptide stimulation of thyrotropin secretion in the larval bullfrog: Evidence for a common neuroregulator of thyroid and interrenal activity in metamorphosis. *J. Exp. Zool.* **252**: 101-104.

DENVER, R.J. y HARVEY, S. (1991). Thyroidal inhibition of chicken pituitary growth hormone: alterations in secretion and accumulation of newly synthesized hormone. *J. Endocrinol.* **131**: 39-48.

DESRUES, L., TONON, M.C. y VAUDRY, H. (1990). Thyrotrophin-releasing hormone stimulates polyphosphoinositide metabolism in the frog neurointermediate lobe. *J. Mol. Endocrinol.* **5**: 129-136.

DEY, S.S., DASMAHAPATRA, A.K., RAY, A.K. y MEDDA, A.K. (1989). Effect of triiodothyronine and thyroxine on malic enzyme activity and protein and nucleic acid contents of liver and muscle of toad, *Bufo melanostictus*. *Horm. metabol. Res.* **21**: 49-50.

DICKHOFF, W.W. y DARLING, D.S. (1983). Evolution of thyroid function and its control in lower vertebrates. *Amer. Zool.* **23**: 697-707.

DICKHOFF, W.W. y SULLIVAN, C. (1987). Involvement of the thyroid gland in smoltification, with special reference to metabolic and developmental processes. *Amer. Fish Soc. Symp.* **1**: 197-210.

DOCTER, R. y KRENNING, E.P. (1990). Role of cellular transport systems in the regulation of thyroid hormone bioactivity. En: "The Thyroid Gland". M.A. Greer (ed.). Raven Press Ltd., New York, pp. 233-254.

DODD, M.H.I. y DODD, J.M. (1976). The Biology of Metamorphosis. En: "Physiology of the Amphibia". B. Lofts (ed.). Academic Press, New York. Vol. 3, pp. 467-599.

DOERR-SCHOTT, J. (1980). Immunohistochemistry of the adenohypophysis of non-mammalian vertebrates. *Acta Histochem. Suppl.* **22S**: 185-223.

DOMÍNGUEZ, J.L., CORPAS, I., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1991). Influence of thiouracil and thyroid hormones on testicular function in *Rana perezi*. *Belg. J. Zool.* **121**: 134-135.

DUAN, W., ACHEN, M.G., RICHARDSON, S.J., LAWRENCE, M.C., WETTENHALL, R.E.H., JAWOROWSKI, A. y SCHREIBER, G. (1991). Isolation, characterization, cDNA cloning and gene expression of an avian transthyretin. Implications for the evolution of structure and function of transthyretin in vertebrates. *Eur. J. Biochem.* **200**: 679-687.

DUELLMAN, W.E. y TRUEB, L. (1986). "Biology of Amphibians". McGraw-Hill, Inc., New York.

DUMONT, J.E., LAMY, F., ROGER, P. y MAENHAUT, C. (1992). Physiological and pathological regulation of thyroid cell proliferation and differentiation by thyrotropin and other factors. *Physiol. Rev.* **72**: 667-697.

DUNN, A.D. (1975). Iodine metabolism in the Ascidian, *Molgula manhattensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **25**: 83-95.

DUNN, A.D. y DUNN, J.T. (1988). Cysteine proteinases from human thyroids and their actions on thyroglobulin. *Endocrinology* **123**: 1089-1097.

DUPRÉ, R.K., JUST, J.J. y RITCHART, J.P. (1986a). Thyroid hormones and behavioral thermoregulation by *Xenopus laevis*: Differential effects of thyroxine and triiodothyronine. *Can. J. Zool.* **64**: 1076-1079.

DUPRÉ, R.K., JUST, J.J., CRAWFORD Jr., E.C. y POWELL, T.L. (1986b). Temperature preference and responses of cutaneous temperature-sensitive neurons during bullfrog development. *Physiol. Zool.* **59**: 254-262.

DUTTON, G.J. (ed.) (1980). Glucuronidation of Drugs and Other Compounds. CRC Press, Boca Raton.

EALES, J.G. (1985). The peripheral metabolism of thyroid hormones and regulation of thyroidal status in poikilotherms. *Can. J. Zool.* **63**: 1217-1231.

EALES, J.G. (1988). The influence of nutritional state on thyroid function in various vertebrates. *Amer. Zool.* **28**: 351-362.

EALES, J.G. (1990). Thyroid function in poikilotherms. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. Vol. 342. A. Epplé, C.G. Scanes, M.H. Stetson (eds.). Wiley-Liss, Inc., New York, pp. 415-420.

EALES, J.G. y FLETCHER, G.L. (1982). Circannual cycles of thyroid hormones in plasma of winter flounder (*Pseudopleuronectes americanus* Walbaum). *Can. J. Zool.* **60**: 304-309.

EALES, J.G. y SHOSTAK, S. (1985). Free  $T_4$  and  $T_3$  in relation to total hormone, free hormone indices, and protein in plasma of rainbow trout and arctic charr. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 291-302.

EALES, J.G. y FINNISON, K.R. (1991). Response of hepatic thyroxine 5'-deiodinase of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, to chronic ingestion of 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *J. Exp. Zool.* **257**: 230-235.

EALES, J.G., HUGHES, M. y UIN, L. (1981). Effect of food intake on diel variation in plasma thyroid hormone levels in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**: 167-174.

EALES, J.G., OMELJANIUK, R.J. y SHOSTAK, S. (1983). Reverse  $T_3$  in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 395-406.

EALES, J.G., HIGGS, D.A., UIN, L.M., MacLATCHY, D.L., BRES, O., McBRIDE, J.R. y DOSANJH, B.S. (1990). Influence of dietary lipid and carbohydrate levels and chronic

- 3,5,3'-triiodo-L-thyronine treatment on thyroid function in immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**: 146-154.
- ECKHOLM, R. (1990). Biosynthesis of thyroid hormones. *Int. Rev. Cytol.* **120**: 243-288.
- EDWARDS, M.L.O. y PIVORUN, E.B. (1991). The effects of photoperiod and different dosages of melatonin on metamorphic rate and weight gain in *Xenopus laevis* tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**: 28-38.
- EICHLER, V.B. y GRAY, L.S. (1976). The influence of environmental lighting on the growth and prometamorphic development of larval *Rana pipiens*. *Develop. Growth & Differ.* **18**: 177-182.
- ELIAS, A.N., GOODMAN, M.M., LIEM, W.H. y BARR, R.J. (1993). Propylthiouracil in psoriasis: Results of an open trial. *J. Am. Acad. Dermatol.* **29**: 78-81.
- ERFURTH, E.M. y HEDNER, P. (1987). Increased plasma gonadotropin levels in spontaneous hyperthyroidism reproduced by thyroxine but not by triiodothyronine administration to normal subjects. *J. Clin. Endocrinol. Metabol.* **64**: 698-703.
- ERICSON, L.E. (1980). Vinblastine-induced inhibition of protein transport in the mouse thyroid *in vivo*. *Endocrinology* **106**: 833-841.
- ERICSON L.E. (1981). Exocytosis and endocytosis in the thyroid follicle cell. *Mol. Cell. Endocrinol.* **22**: 1-24.
- ESCOBAR, F., ESCOBAR, H. y MORREALE, G. (1992). Fisiología del tiroides. En: "Fisiología Humana". J.A.F. Tresguerres (ed.). Interamericana-McGraw-Hill, Madrid. Cap. 76, pp. 947-970.
- ETKIN, W. (1968). Hormonal control of amphibian metamorphosis. En: "Metamorphosis, a Problem in Developmental Biology". W. Etkin, L.I. Gilbert (eds.). Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 313-348.
- FELDMAN, S. y WEIDENFELD, J. (1993). The dorsal hippocampus modifies the negative feedback effect of glucocorticoids on the adrenocortical and median eminence CRF-41 responses to photic stimulation. *Brain Res.* **614**: 227-232.
- FENOGLIO, C., BERNOCCHI, G. y BARNI, S. (1992). Frog hepatocyte modifications induced by seasonal variations: a morphological and cytochemical study. *Tissue & Cell* **24**: 17-29.
- FLOOD, C.G. y EALES, J.G. (1983). Effects of starvation and refeeding on plasma T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> levels and T<sub>4</sub> deiodination in rainbow trout, *Salmo gairdneri*. *Canad. J. Zool.* **61**: 1949-1953.
- FOLCH, J., LEES, M. y SLOANE-STANLEY, G.H. (1957). A simple method for the isolation and purification of total lipides from animal tissues. *J. Biol. Chem.* **226**: 497-509.

- FOSTER, R.G. y ROBERTS, A. (1982). The pineal eye in *Xenopus laevis* embryos and larvae: A photoreceptor with a direct excitatory effect on behaviour. *J. Comp. Physiol.* **145A**: 413-419.
- FREDRICKSON, G., ERICSON, L.E. y OLSSON, R. (1984). Iodine binding in the endostyle of larval *Branchiostoma lanceolatum* (Cephalocordata). *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**: 177-184.
- FRIEDEN, E. (1981). Iodine and the thyroid hormones. *TIBS* Febrero, pp. 50-53.
- GABRION, J., TRAVERS, F., BENYAMIN, Y., SENTEN, P. y VAN THOAI, N. (1980). Characterization of actin microfilaments at the apical pole of thyroid cells. *Cell. Biol. Int. Rep.* **4**: 59-67.
- GAGNON, J., GALLO-PAYET, N., LEHOUX, J.G., BELISLE, S. y BELLABARBA, D. (1992). Characterization of 3,5,3'-triiodothyronine receptors in primary cultures of hepatocytes and neurons from chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 193-207.
- GALTON, V.A. (1980a). Binding of thyroid hormones *in vivo* by hepatic nuclei of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **106**: 859-866.
- GALTON, V.A. (1980b). Binding of thyroid hormones in serum and liver cytosol of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **107**: 61-69.
- GALTON, V.A. (1980c). Binding of thyroid hormones *in vivo* by hepatic nuclei of *Rana catesbeiana* tadpoles at different stages of metamorphosis. *Endocrinology* **107**: 1910-1915.
- GALTON, V.A. (1984). Putative nuclear triiodothyronine receptors in tadpole erythrocytes: Regulation of receptor number by thyroid hormone. *Endocrinology* **114**: 735-742.
- GALTON, V.A. (1985). 3,5,3'-triiodothyronine receptors and thyroxine 5'-monodiodinating activity in thyroid hormone insensitive Amphibia. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 465-471.
- GALTON, V.A. (1986). Thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine bind to the same putative receptor in hepatic nuclei of *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **118**: 1114-1118.
- GALTON, V.A. (1988a). Iodothyronine 5'-deiodinase activity in the amphibian *Rana catesbeiana* at different stages of the life cycle. *Endocrinology* **122**: 1746-1750.
- GALTON, V.A. (1988b). The role of thyroid hormone in amphibian development. *Amer. Zool.* **28**: 309-318.
- GALTON, V.A. (1990). Mechanisms underlying the acceleration of thyroid hormone-induced tadpole metamorphosis by corticosterone. *Endocrinology* **127**: 2997-3002.
- GALTON, V.A. (1992). Thyroid hormone receptors and iodothyronine deiodinases in the developing Mexican axolotl, *Ambystoma mexicanum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 62-70.

GALTON, V.A. e INGBAR, S.H. (1962). Observations on the relation between the action and degradation of thyroid hormones as indicated by studies in the tadpole and the frog. *Endocrinology* **70**: 622-632.

GALTON, V.A. y MUNCK, K. (1981). Metabolism of thyroxine in *Rana catesbeiana* tadpoles during metamorphic climax. *Endocrinology* **109**: 1127-1131.

GALTON, V.A. y SCHAAFSMA, J. (1983). Binding of thyroid hormones to isolated hepatic nuclei from *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **112**: 1999-2006.

GALTON, V.A. y ST. GERMAIN, D.L. (1985). Putative nuclear triiodothyronine receptors in tadpole erythrocytes during metamorphic climax. *Endocrinology* **116**: 99-104.

GALTON, V.A. y HIEBERT, A. (1987a). The ontogeny of the enzyme systems for the 5'- and 5-deiodination of thyroid hormones in chick embryo liver. *Endocrinology* **120**: 2604-2610.

GALTON, V.A. y HIEBERT, A. (1987b). Hepatic iodothyronine 5-deiodinase activity in *Rana catesbeiana* tadpoles at different stages of the life cycle. *Endocrinology* **121**: 42-47.

GALTON, V.A. y HIEBERT, A. (1988). The ontogeny of the iodothyronine 5'-monodeiodinase activity in *Rana catesbeiana* tadpoles. *Endocrinology* **122**: 640-645.

GALTON, V.A., COHEN, J.S. y MUNCK, K. (1982). T<sub>4</sub> 5'-monodeiodinase: The acquisition and significance of this enzyme system in the developing *Rana catesbeiana* tadpole. En: "Phylogenetic aspects of thyroid hormone actions". Institute of Endocrinology, Gunma University (ed.). Center for Academic Publications Japan, Tokyo. Vol. 19, pp. 75-90.

GANCEDO, B. (1988). "Reproducción en Anfibios Anuros: Estudio *in vitro* del papel de la melatonina y del factor liberador de gonadotropinas (GnRH)". Tesis de Licenciatura, Universidad Complutense de Madrid.

GANCEDO, B., CORPAS, I., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1991a). Is a GnRH-like factor one of the hypothalamic hormones that stimulates pituitary TSH release during amphibian metamorphosis?. *Pflügers Arch.* **418**: R192. Abstr. 144.

GANCEDO, B., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1991b). Lack of *in vitro* melatonin action on the gonadal function of two anuran amphibian species, *Rana perezi* and *Discoglossus pictus*. *Zool. Sci.* **8**: 541-547.

GANCEDO, B., CORPAS, I., ALONSO-GÓMEZ, A.L., DELGADO, M.J., MORREALE DE ESCOBAR, G., y ALONSO-BEDATE, M. (1992). Corticotropin-releasing factor stimulates metamorphosis and increases thyroid hormone concentration in prometamorphic *Rana perezi* larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **87**: 6-13.

GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., De PEDRO, N., VALENCIANO, A.I., DELGADO, M.J., y ALONSO-BEDATE, M. (1994a). Ontogeny of thyroid hormones daily changes in two anuran species (*Rana perezi* and *Xenopus laevis*). *Neth. J. Zool.* (en revisión).

GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., De PEDRO, N., DELGADO, M.J., y ALONSO-BEDATE, M. (1994b). Daily changes in thyroid activity in the frog *Rana perezi*. Variation with season. *Physiol. Zool.* (en revisión).

GANCEDO, B., ALONSO-GÓMEZ, A.L., De PEDRO, N., CORPAS, I., DELGADO, M.J., y ALONSO-BEDATE, M. (1994c). Seasonal changes in thyroid activity in male and female frog, *Rana perezi*. *Gen. Comp. Endocrinol.* (en prensa).

GARCÍA-NAVARRO, S., MALAGÓN, M.M. y GRACIA-NAVARRO, F. (1988). Immunohistochemical localization of thyrotropic cells during amphibian morphogenesis: A stereological study. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 116-123.

GARCÍA PARIS, M. (1985). Los anfibios de España. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación. Publicaciones de extensión agraria, Madrid.

GAVIN, L.A., MOELLER, M. McMAHON, F., GULLI, R. y CAVALIERI, R.R. (1990). Cyclic adenosine 3',5'-monophosphate and glucose stimulate thyroxine 5'-deiodinase type II in cultured mouse neuroblastoma cells. *Metabolism* **39**: 474-479.

GEORGE, J.C. y JOHN, T.M. (1990). Canada goose thyroid: seasonal and ultrastructural changes in relation to circulating levels of its hormones. *Cytobios* **61**: 97-115.

GIRAUD, A., FRANC, J.-L., LONG, Y. y RUF, J. (1992). Effects of deglycosilation of human thyroperoxidase on its enzymatic activity and immunoreactivity. *J. Endocrinol.* **132**: 317-323.

GLENNEMEIER, K.A. y LICHT, P. (1993). Comparative studies of thyroxine binding proteins in turtle plasma using column chromatography. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**: 119-131.

GLOWA, J.R., BARRET, J.E., RUSSELL, J. y GOLD, P.W. (1992). Effects of corticotropin releasing hormone on appetitive behaviors. *Peptides* **13**: 609-621.

GLOWA, J.R. y GOLD, P.W. (1991). Corticotropin releasing hormone produces profound anorexigenic effects in the rhesus monkey. *Neuropeptides* **18**: 55-61.

GOLDMAN, S., DIRNFELD, M., ABRAMOVICI, H. y KRAIEM, Z. (1993). Triiodothyronine (T<sub>3</sub>) modulates hCG-regulated progesterone secretion, cAMP accumulation and DNA content in cultured human luteinized granulosa cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **96**: 125-131.

GONA, A.G. (1977). Thyroid-induced maturation of the cerebellar cortex in the frog. En: "Thyroid Hormones and Brain Development". G.D. Grave (ed.). Raven Press, New York. Cap. 7, pp. 107-117.

GONZÁLEZ, G.C. y LEDERIS, K. (1988). Sauvagine-like and corticotropin-releasing factor-like immunoreactivity in the brain of the bullfrog (*Rana catesbeiana*). *Cell Tissue Res.* **253**: 29-37.

GONZÁLEZ, G.C., BELENKY, M.A., POLENOV, A.L. y LEDERIS, K. (1992). Comparative localization of corticotropin and corticotropin-releasing factor-like peptides in the brain and hypophysis of a primitive vertebrate, the sturgeon *Acipenser ruthenus* L. *J. Neurocytol.* **21**: 885-896.

GOOS, H.J.Th. (1978). Hypophysiotropic centers in the brain of amphibians and fish. *Amer. Zool.* **18**: 401-410.

GORBMAN, A. (1964). Endocrinology of the Amphibia. En: "Physiology of the Amphibia". J.A. Moore (ed.). Academic Press, New York. pp. 371-425.

GORDON, J.T., CRUTCHFIELD, F.L., JENNINGS, A.S., DRATMAN, M.B. (1982). Preparation of lipid-free tissue extracts for chromatographic determination of thyroid hormones and metabolites. *Arch. Biochem. Biophys.* **216**: 407-418.

GOSNER, K.L. (1960). A simplified table for staging anuran embryos and larvae with notes on identification. *Herpetologica* **16**: 183-190.

GRACIA-NAVARRO, F., MALAGÓN, M.M., GARCÍA-NAVARRO, S., RUIZ-NAVARRO, A. y CASTAÑO, J. (1990). Response of amphibian pituitary cells to thyrotropin-releasing hormone (TRH) stimulation. En: "Biology and Physiology of Amphibians". Progress in Zoology. W. Hanke (ed.). Gustav Fisher Verlag, Stuttgart/New York. Vol 38, pp. 209-218.

GRACIA-NAVARRO, F., CASTAÑO, J.P., MALAGÓN, M.M. y TORRONTERAS, R. (1991). Subcellular responsiveness of amphibian growth hormone cells after TSH-releasing hormone stimulation. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**: 94-103.

GRACIA-NAVARRO, F., LAMACZ, M., TONON, M.C. y VAUDRY, H. (1992). Pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide stimulates calcium mobilization in amphibian pituitary cells. *Endocrinology* **131**: 1069-1074.

GRANT Jr., W.C. y WATERMAN, A.J. (1961). Effect of light on thyroid activity in *Diemictylus viridescens*. *Amer. Zool.* **1**: 357.

GRAU, E.G. (1988). Environmental influences on thyroid function in teleost fish. *Amer. Zool.* **28**: 329-335.

GRAU, E.G., BROWN, C.L. y STETSON, M.H. (1985). Photoperiodic regulation of thyroid responsiveness to TSH in *Fundulus heteroclitus*. *J. Exp. Zool.* **234**: 199-205.

GRAVE, G.D. (ed.) (1977). "Thyroid Hormones and Brain Development". Raven Press, New York.



- GRAY, K.M. y JANSSENS, P.A. (1990). Gonadal hormones inhibit the induction of metamorphosis by thyroid hormones in *Xenopus laevis* tadpoles *in vivo*, but not *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**: 202-211.
- GREER, M.A., SATO, N., WANG, X., GREER, S.E. y McADAMS, S. (1993). Evidence that the major physiological role of TRH in the hypothalamic paraventricular nuclei may be to regulate the set-point for thyroid hormone negative feedback on the pituitary thyrotroph. *Neuroendocrinology* **57**: 569-575.
- GROSCOLAS, R. y LELOUP, J. (1986). The endocrine control of reproduction and molt in male and female emperor (*Aptenodytes forsteri*) and adelin (*Pygoscelis adeliae*) penguins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 264-274.
- GROSCOLAS, R. y LELOUP, J. (1989). The effect of severe starvation and captivity stress on plasma thyroxine and triiodothyronine concentrations in an antarctic bird (Emperor penguin). *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**: 108-117.
- GUERRERO, J.M., GONZÁLEZ-BRITO, A., SANTANA, C. y REITER, R.J. (1989). Nocturnal increase of type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the syrian hamster harderian gland is abolished by light exposure and induced by isoproterenol. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.* **190**: 186-189.
- GUERRERO, J.M., SANTANA, C. y REITER, R.J. (1990). Type II thyroxine 5'-deiodinase activity in the rat brown adipose tissue, pineal gland, harderian gland, and cerebral cortex: effect of acute cold exposure and lack of relationship to pineal melatonin synthesis. *J. Pineal Res.* **9**: 159-166.
- GUTIÉRREZ, P., DELGADO, M.J. y ALONSO-BEDATE, M. (1984). Influence of photoperiod and melatonin administration on growth and metamorphosis in *Discoglossus pictus* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **79A**: 255-260.
- HAIBACH, H. (1971). Free iodothyronines in the rat thyroid gland. *Endocrinology* **88**: 149-154.
- HALPERIN, Y., SHAPIRO, L.E. y SURKS, M.I. (1991). Role of L-thyroxine in nuclear thyroid hormone receptor occupancy and growth hormone production in cultured GC cells. *J. Clin. Invest.* **88**: 1291-1299.
- HANAOKA, Y., KOYA, S.M., KONDO, Y., KOBAYASHI, Y. y YAMAMOTO, K. (1973). Morphological and functional maturation of the thyroid during early development of anuran larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **21**: 410-423.
- HANKEN, J. y SUMMERS, C.H. (1988). Skull development during anuran metamorphosis: III. Role of thyroid hormone in chondrogenesis. *J. Exp. Zool.* **246**: 156-170.
- HANKEN, J., SUMMERS, C.H. y HALL, B.K. (1989). Morphological integration in the cranium during anuran metamorphosis. *Experientia* **45**: 872-875.

HARMS, P.J., TU, G.F., RICHARDSON, S.J., ALDRED, A.R., JAWOROWSKI, A. y SCHREIBER, G. (1991). Transthyretin (prealbumin) gene expression in choroid plexus is strongly conserved during evolution of vertebrates. *Comp. Biochem. Physiol. B.* **99**: 239-249.

HAYASHI, H., OHMIYA, Y. y SUZUKI, S. (1991). Tyrosine-130 in bullfrog thyroglobulin is a thyroid hormone generating site. *FEBS Lett.* **292**: 168-170.

HAYASHI, H., HAYASHI, T. y HANAOKA, Y. (1992). Amphibian lutropin and follitropin from the bullfrog *Rana catesbeiana*. Complete amino acid sequence of the alpha subunit. *Eur. J. Biochem.* **203**: 185-191.

HAYES, T.B. y LICHT, P. (1993). Metabolism of exogenous steroids by anuran larvae. *Gen. Comp. Endocrinol.* **91**: 250-258.

HAYES, T., CHAN, R. y LICHT, P. (1993). Interactions of temperature and steroids on larval growth, development, and metamorphosis in a toad (*Bufo boreas*). *J. Exp. Zool.* (en prensa).

HAYS, M.T. y CAVALIERI, R.R. (1992). Deiodination and deconjugation of the glucuronide conjugates of the thyroid hormones by rat liver and brain microsomes. *Metabolism* **41**: 494-497.

HELBING, C., GERGELY, G. y ATKINSON, B.G. (1992). Sequential up-regulation of thyroid hormone beta receptor, ornithine transcarbamylase and carbamyl phosphate synthetase mRNAs in the liver of *Rana catesbeiana* tadpoles during spontaneous and thyroid hormone-induced metamorphosis. *Dev. Genet.* **13**: 289-301.

HENNEMAN, G. y DOCTER, R. (1990). Plasma transport proteins and their role in tissue delivery of thyroid hormone. En: "The Thyroid Gland". M.A. Greer (ed.). Raven Press, New York, pp. 221-231.

HERMAN, C.A. (1992). Endocrinology. En: "Environmental Physiology of the Amphibians". M.E. Feder, W.W. Burggren (eds.). The University of Chicago Press, Chicago/London. Cap. 3, pp. 40-54.

HERRMANN, F., PESCHKE, E., PEIL, J., AMBSCH, K.H., SORGER, D., HERZMANN, A. y SCHMIDT, H.-E. (1990). Circannual oscillations of function compared with morphometric changes in the thyroid gland of the Wistar-rat. *Exp. Clin. Endocrinol.* **96**: 157-167.

HERZOG, V. (1984). Pathways of endocytosis in thyroid follicle cells. *Int. Rev. Cytol.* **91**: 107-139.

HIASA, Y., NISHIOKA, H., KITAHORI, Y., YANE, K., NAKAOKA, S., OHSHIMA, M., KONISHI, N., NISHII, K., KITAMURA, M. y SUGIMURA, M. (1991). Immunohistochemical detection of estrogen receptors in paraffin sections of human thyroid tissues. *Oncology* **48**: 421-424.

HICKS, M., WONG, L.S. y DAY, R.O. (1992). Antioxidant activity of propylthiouracil. *Biochem. Pharmacol.* **43**: 439-444.

HIGGS, D.A., FAGERLUND, U.H.M., EALES, J.G. y McBRIDE, J.R. (1982). Application of thyroid and steroid hormones as anabolic agents in fish culture. *Comp. Biochem. Physiol.* **73B**: 143-176.

HILL, R.W. y WYSE, G.A. (1992). Relaciones térmicas. En: "Fisiología Animal". 2ª Ed.. Ediciones Akal, Madrid. Cap. 6, pp. 76-135.

HIMICK, B.A. y EALES, J.G. (1990). The acute effects of food and glucose challenge on plasma thyroxine and triiodothyronine levels in previously starved rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 34-41.

HOCHACHKA, P.W. y SOMERO, G.N. (1984). "Biochemical Adaptation". Princeton University Press. Princeton, New Jersey.

HOFMANN, M.H., MICHLER, A. y MEYER, D.L. (1989). Thyroxine influences neuronal connectivity in the adult frog brain. *Brain Res.* **492**: 389-391.

HOLBECK, A., BÖCKERS, T.M., WITTKOWSKI, W. y SOURGENS, H. (1993). Ultrastructure of fetal *pars tuberalis*-specific secretory cells under the influence of propylthiouracil and thyroxine. *Acta Anat.* **147**: 64-68.

HOSKINS, S.G. (1990). Metamorphosis of the amphibian eye. *J. Neurobiol.* **21**: 970-989.

HOUDRY, J. (1993). Passage to the terrestrial life in amphibians: Events accompanying this ecological transition. *Zool. Sci.* **10**: 715-731.

HOUDRY, J. y BEAUMONT, A. (1985). Les métamorphoses des Amphibiens. Fondation Singer-Polignac y Masson, Paris.

HSU, C.Y., LU, M.H., HUANG, H.T. y LIANG, H.M. (1985a). The correlation of fine structure with endocrine function of ovarian follicle cells in tadpoles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **56**: 77-87.

HSU, C.Y., CHANG, L.T., KU, H.H. y LU, M.H. (1985b). *In vitro* estradiol synthesis and secretion by tadpole ovaries of different developmental stages. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 393-396.

HSU, C.Y., CHANG, L.T., YU, N.W., KU, H.H. y LU, M.H. (1988). *In vitro* inhibition of estradiol secretion of tadpole ovaries by cyanoketone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 41-45.

HSU, C.Y., YU, N.W., CHANG, L.T., KU, H.H. y LU, M.H. (1989). Estradiol secretion by the ovarian tissue, in response to hypophyseal stimulation, during ontogenesis of the bullfrog. *Gen. Comp. Endocrinol.* **74**: 161-164.

HUTCHISON, V.H. y DUPRÉ, R.K. (1992). Thermoregulation. En: "Environmental Physiology of the Amphibians". M.E. Feder, W.W. Burggren (eds.). The University of Chicago Press, Chicago/London. Cap. 9, pp. 206-249.

IKEDA, T., FUJIYAMA, K., HOSHINO, T., TANAKA, Y., TAKEUCHI, T., MASHIBA, H. y TOMINAGA, M. (1991). Stimulating effect of thyroid hormone on Insulin-like Growth Factor I release and synthesis by perfused rat liver. *Growth Regul.* 1: 39-41.

IKUTA, K., AIDA, K., OKUMOTO, N. y HANYU, I. (1987). Effects of sex steroids on the smoltification of masu salmon (*Oncorhynchus masou*). *Gen. Comp. Endocrinol.* 65: 99-110.

IRIUCHIJIMA, T., MICHIMATA, T., MIYASHITA, K., OGIWARA, T., YAMADA, M., MURAKAMI, M. y MORI, M. (1992). Thyroid hormones regulate the formation of inositol phosphate in response to thyrotropin-releasing hormone in rat anterior pituitaries. *Neuropeptides* 21: 49-53.

ISHIZUYA-OKA, A. y SHIMOZAWA, A. (1991). Induction of metamorphosis by thyroid hormone in anuran small intestine cultured organotypically *in vitro*. *In vitro Cell. Dev. Biol.* 27A: 853-857.

JACKSON, I.M.D. y REICHLIN, S. (1974). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Distribution in hypothalamic and extrahypothalamic brain tissues of mammalian and submammalian chordates. *Endocrinology* 95: 854-862.

JACKSON, I.M.D., SAPERSTEIN, R. y REICHLIN, S. (1977). Thyrotropin releasing hormone (TRH) in pineal and hypothalamus of the frog: effect of season and illumination. *Endocrinology* 100: 97-100.

JACOB, V. y OOMMEN, O.V. (1990). Intermediary metabolism in a lizard, *Calotes versicolor*: Role of thyroid hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 324-336.

JACOBS, G.F.M. y KÜHN, E.R. (1988). Luteinizing hormone-releasing hormone induces thyroxine release together with testosterone in the neotenic axolotl *Ambystoma mexicanum*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 71: 502-505.

JACOBS, G.F.M. y KÜHN, E.R. (1989). Thyroid function may be controlled by several hypothalamic factors in frogs and at least by one in the neotenic axolotl. En: "XIth International Symposium on Comparative Endocrinology. Málaga, Spain". Abstr. P-174.

JACOBS, G.F.M. y KÜHN, E.R. (1990). Presence of thyroxine 5'-monodeiodinase activity in kidney homogenates of the frog, *Rana ridibunda*. *Gen. Comp. Endocrinol.* 77: 456-465.

JACOBS, G.F.M. y KÜHN, E.R. (1992). Thyroid hormone feedback regulation of the secretion of bioactive thyrotropin in the frog. *Gen. Comp. Endocrinol.* 88: 415-423.

- JACOBS, G.F.M., MICHIENSEN, R.P.A. y KÜHN, E.R. (1988a). Thyroxine and triiodothyronine in plasma and thyroids of the neotenic and metamorphosed axolotl *Ambystoma mexicanum*: Influence of TRH injections. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**: 141-151.
- JACOBS, G.F.M., GOYVAERTS, M.P., VANDORPE, G., QUAGHEBEUR, A.M.L. y KÜHN, E.R. (1988b). Luteinizing hormone-releasing hormone as a potent stimulator of the thyroidal axis in ranid frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**: 274-283.
- JIMÉNEZ, J., OSUNA, C., RUBIO, A. y GUERRERO, J.M. (1993). Effect of chronic ethanol administration on the rat pineal N-acetyltransferase and thyroxine type II 5'-deiodinase activities. *Bioscience Rep.* **13**: 91-98.
- JOHN-ALDER, H.B. (1983). Effects of thyroxine supplementation on metabolic rate and metabolic capacity in a lizard. *Amer. J. Physiol.* **244**: R659-R666.
- JOHN-ALDER, H.B. (1984). Seasonal variations in activity, aerobic energetic capacities, and plasma thyroid hormones (T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub>) in an iguana lizard. *J. Comp. Physiol. B* **154**: 409-419.
- JOHN-ALDER, H.B. (1990). Effects of thyroxine on standard metabolic rate and selected intermediary metabolic enzymes in field-active lizards *Sceloporus undulatus*. *Physiol. Zool.* **63**: 600-614.
- JOLIVET-JAUDET, G., INOUE, M., TAKADA, K. e ISHII, S. (1984). Circannual changes in plasma aldosterone levels in *Bufo japonicus formosus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**: 163-167.
- JOOS, B. y JOHN-ALDER, H.B. (1990). Effects of thyroxine on standard and total metabolic rates in the lizard *Sceloporus undulatus*. *Physiol. Zool.* **63**: 873-885.
- JØRGENSEN, C.B. (1974). Integrative functions of the brain. En: "Physiology of the Amphibia". B. Lofts (ed.). Academic Press, New York. Vol. 2, pp. 1-51.
- JØRGENSEN, C.B. y LARSEN, L.O. (1961). Molting and its hormonal control in toads. *Gen. Comp. Endocrinol.* **1**: 145-153.
- JUST, J.J. (1972). Protein-bound iodine and protein concentration in plasma and pericardial fluid of metamorphosing anuran tadpoles. *Physiol. Zool.* **45**: 143-152.
- KAI, O., NAGASE, H., SUZUKI, M., KAKEGAWA, T. y SATO, K. (1993). Effects of hypothyroidism with treatment of an anti-thyroid drug, propylthiouracil on immune responses in chickens. *Vet. Immunol. Immunopathol.* **36**: 123-135.
- KALTENBACH, J.C. y HAGEDORN, H.H. (1981). Effects of nutrition on metamorphosis. En: "CRC Handbook of Nutritional Requirements in a Functional Context. Development and Conditions of Physiologic Stress". M. Recheigl Jr. (ed.). CRC Press, Boca Raton. Vol. I, pp. 81-96.

KANAMORI, A. y BROWN, D.D. (1993). Cultured cells as a model for amphibian metamorphosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **90**: 6013-6017.

KAPLAN, M.M. (1984). The role of thyroid hormone deiodination in the regulation of hypothalamo-pituitary function. *Neuroendocrinology* **38**: 254-260.

KAR, A. y CHANDOLA-SAKLANI, A. (1985). Circulating thyroid hormone concentrations in relation to seasonal events in the male indian garden lizard, *Calotes versicolor*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**: 14-19.

KASINATHAN, S. y GREGALATCHOUMI, S. (1988). Effect of melatonin on the spermatogenesis of *Rana hexadactyla* (Lesson). *Endocrinol. Japon.* **35**: 255-260.

KAWAHARA, A., KOHARA, S. y AMANO, M. (1989). Thyroid hormone directly induces hepatocyte competence for estrogen-dependent vitellogenin synthesis during the metamorphosis of *Xenopus laevis*. *Dev. Biol.* **132**: 73-80.

KAWAHARA, A., BAKER, B.S. y TATA, J.R. (1991). Developmental and regional expression of thyroid hormone receptor genes during *Xenopus* metamorphosis. *Development* **112**: 933-943.

KAWAMURA, K., YAMAMOTO, K. y KIKUYAMA, S. (1986). Effects of thyroid hormone, stalk section and transplantation of the pituitary gland on plasma prolactin levels at metamorphic climax in *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**: 129-135.

KECK, F.S., WOLF, Ch.F. y PFEIFFER, E.F. (1990). The influence of circulating thyroxine serum concentration on hepatic thyroxine deiodinating activity in rats. *Exp. Clin. Endocrinol.* **96**: 269-277.

KIKUYAMA, S. (1989). Role of prolactin and growth hormone in development in lower vertebrates. En: "Kyoto Prolactin Conference". K. Hoshino (ed.). Shinko Printing Co., Ltd., Kyoto, Japan. Vol. 4, pp. 124-135.

KIKUYAMA, S. (1991). Endocrine control of amphibian metamorphosis. *Zool. Sci.* **8**: 1025.

KIKUYAMA, S., YAMAMOTO, K. y MAYUMI, M. (1980). Growth-promoting and antimetamorphic hormone in pituitary glands of bullfrog. *Gen. Comp. Endocrinol.* **41**: 212-216.

KIKUYAMA, S., NIKI, K., MAYUMI, M. y KAWAMURA, K. (1982). Retardation of thyroxine-induced metamorphosis by amphenone B in toad tadpoles. *Endocrinol. Japon.* **29**: 659-662.

KIKUYAMA, S., NIKI, K., MAYUMI, M., SHIBAYAMA, R., NISHIKAWA, M. y SHINTAKE, N. (1983). Studies on corticoid action on the toad tadpole tail *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **52**: 395-399.

- KIKUYAMA, S., YAMAMOTO, K., SEKI, T., NIKI, K. y YOSHIZATO, K. (1985). Corticoids and prolactin: hormones influencing amphibian metamorphosis. En: "Current Trends in Comparative Endocrinology". B. Lofts, W.N. Holmes (eds.). Hong Kong University Press, Hong Kong. Vol 1, pp. 535-537.
- KIKUYAMA, S., SUZUKI, M.R. e IWAMURO, S. (1986). Elevation of plasma aldosterone levels of tadpoles at metamorphic climax. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 186-190.
- KIKUYAMA, S., KOIWAI, K., SAKAI, M., SEKI, T. y YANAGISAWA, T. (1987). Prolactin-releasing factor in frog hypothalamus. En: "Kyoto Prolactin Conference". K. Hoshino (ed.). Shinko Printing Co., Ltd., Kyoto, Japan. Vol. 2, pp. 123-131.
- KIKUYAMA, S., YAMAMOTO, K. y KAWAMURA, K. (1988). Hormonal regulation of amphibian metamorphosis. *Proc. 6th M. Singer Symp.*, pp. 161-171.
- KIKUYAMA, S., KAWAMURA, K., TANAKA, S. y YAMAMOTO, K. (1993). Aspects of amphibian metamorphosis: Hormonal control. *Int. Rev. Cytol.* **145**: 105-148.
- KING, J.A. y MILLAR, R.P. (1981). TRH, GH-RH, and LH-RH in metamorphosing *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **44**: 20-27.
- KISTLER, A., YOSHIZATO, K. y FRIEDEN, E. (1975). Binding of thyroxine and triiodothyronine by nuclei of isolated tadpole liver cells. *Endocrinology* **97**: 1036-1042.
- KLANDORF, H., BLAUWIEKEL, R., QIN, X. y RUSSELL, R.W. (1992). Characterization of a sustained-release estrogen implant on oviduct development and plasma Ca concentrations in broiler breeder chicks: modulation by feed restriction and thyroid state. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 469-482.
- KLOAS, W. y HANKE, W. (1992). Localization of binding sites for atrial natriuretic factor and angiotensin II in the central nervous system of the clawed toad *Xenopus laevis*. *Cell Tissue Res.* **267**: 365-373.
- KNIAZEWSKI, B., OSTROWSKA, Z., ZWIRSKA-KORCZALA, K. y BUNTNER, B. (1990). The influence of pinealectomy and single dose of melatonin administered at different times of day on serum T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> concentrations in rats. *Acta Physiol. Pol.* **41**: 117-126.
- KOLLROS, J.J. (1961). Mechanisms of amphibian metamorphosis: Hormones. *Amer. Zool.* **1**: 107-114.
- KOSTROUCH, Z., MUNARI-SILEM, Y., RAJAS, F., BERNIER-VALENTIN, F. y ROUSSET, B. (1991). Thyroglobulin internalized by thyrocytes passes through early and late endosomes. *Endocrinology* **129**: 2202-2211.
- KOVÁCS, K. y PÉCZELY, P. (1983). Phase shifts in circadian rhythmicity of total, free corticosterone and transcortine plasma levels in hypothyroid male Japanese quails. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 483-489.

KUCHLER, K., RICHTER, K., TRNOVSKY, J., EGGER, R. y KREIL, G. (1990). Two precursors of thyrotropin-releasing hormone from skin of *Xenopus laevis*. Each contains seven copies of the end product. *J. Biol. Chem.* **265**: 11731-11733.

KÜHN, E.R. (1990). Hormonal control of peripheral monodeiodination in vertebrates. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. A. Epplé, C.G. Scanes, M.H. Stetson (eds.). Wiley-Liss, Inc., New York. Vol. 342, pp. 421-426.

KÜHN, E.R. (1993). Role of growth hormone in thyroid function of vertebrates. *Klasee der Wetenschappen* **55**: 1-13.

KÜHN, E.R., DELMOTTE, N.M.J. y DARRAS, V.M. (1983). Persistence of a circadian rhythmicity for thyroid hormones in plasma and thyroid of hibernating male *Rana ridibunda*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 383-394.

KÜHN, E.R., DECUYPERE, E. y RUDAS, P. (1984a). Hormonal and environmental interactions on thyroid function in the chick embryo and posthatching chicken. *J. Exp. Zool.* **232**: 653-658.

KÜHN, E.R., JACOBS, G.F.M. y MICHELSEN, R.P.A. (1984b). Thyroxine as the trigger for thyroid activation in the hibernating frog *Rana ridibunda*. *IRCS Med. Sci.* **12**: 168.

KÜHN, E.R., DARRAS, V.M. y VERLINDEN, T.M. (1985a). Annual variations of thyroid reactivity following thyrotropin stimulation and circulating levels of thyroid hormones in the frog *Rana ridibunda*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 266-273.

KÜHN, E.R., KIKUYAMA, S., YAMAMOTO, K. y DARRAS, V.M. (1985b). *In vivo* release of prolactin in *Rana ridibunda* following an intravenous injection of thyrotropin-releasing hormone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**: 86-89.

KÜHN, E.R., PEETERS, R. y PAUWELS, J. (1986a). Stimulation of the hepatic 5'-monodeiodination activity in the adult male rat following injection of ovine growth hormone. *IRCS Med. Sci.* **14**: 804.

KÜHN, E.R., Van OSSELAER, P., SIAU, O., DECUYPERE, E. y MOREELS, A. (1986b). Thyroid function in newborn lambs: influence of prolactin and growth hormone. *J. Endocr.* **109**: 215-219.

KÜHN, E.R., VERHEYEN, G., CHIASSON, R.B., HUTS, C., HUYBRECHTS, L., Van den STEEN, P. y DECUYPERE, E. (1987a). Growth hormone stimulates the peripheral conversion of thyroxine into triiodothyronine by increasing the liver 5'-monodeiodinase activity in the fasted and normal fed chicken. *Horm. metabol. Res.* **19**: 304-308.

KÜHN, E.R., GEVAERTS, H., JACOBS, G. y VANDORPE, G. (1987b). Reproductive cycle, thyroxine and corticosterone in females of the giant swamp frog *Dicroglossus occipitalis* at the equator. *Gen. Comp. Endocrinol.* **66**: 137-144.



KÜHN, E.R., GEVAERTS, H., VANDORPE, G. y JACOBS, G.F.M. (1987c). Plasma concentrations of testosterone and thyroxine in males of the giant swamp frog *Dicroglossus occipitalis* at the equator. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**: 492-493.

KÜHN, E., JACOBS, G. y VANDORPE, G. (1990). Thyroid function and a possible thyroidal-gonadal interaction in reproduction and circannual rhythmicity. En: "Biology and Physiology of Amphibians". Progress in Zoology. W. Hanke (ed.). Gustav Fisher Verlag, Stuttgart/New York. Vol 38, pp. 3-27.

KÜHN, E.R., BERGHMAN, L.R., MOONS, L., VANDESANDE, F., DECUYPERE, E. y DARRAS, V.M. (1993a). Hypothalamic and peripheral control of thyroid function during the life cycle of the chicken. En: "Avian Endocrinology". P.J. Sharp (ed.). Journal of Endocrinology Ltd., Bristol, pp. 29-46.

KÜHN, E.R., MOL, K.A. y DARRAS, V.M. (1993b). Control strategies of thyroid hormone monodeiodination in vertebrates. *Zool. Sci.* **10**: 873-885.

KUPWADE, V.A. y SAIDAPUR, S.K. (1986). Effect of melatonin on oocyte growth and recruitment, hypophysial gonadotropins and oviduct of the frog *Rana cyanophlyctis* maintained under natural photoperiod during the prebreeding phase. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**: 284-292.

KVETNY, J. y MATZEN, L.E. (1990). Effect of thyroxine on cellular oxygen-consumption and glucose uptake: evidence of an effect of total  $T_4$  and not "free  $T_4$ ". *Horm. metab. Res.* **22**: 485-489.

LAGERSPETZ, K.Y.H., HARRI, M.N.E. y OKSLAHTI, R. (1974). The role of the thyroid in the temperature acclimation of the oxidative metabolism in the frog *Rana temporaria*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **22**: 169-176.

LAMACZ, M., HINDELANG, C., TONON, M.C., VAUDRY, H. y STOECKEL, M.E. (1989). Three distinct thyrotropin-releasing hormone-immunoreactive axonal systems project in the median eminence-pituitary complex of the frog *Rana ridibunda*. Immunocytochemical evidence for co-localization of thyrotropin-releasing hormone and mesotocin in fibers innervating pars intermedia cells. *Neuroscience* **32**: 451-462.

LANGE, C.B., HANKE, W. y MORISHIGE, W.K. (1989). Corticosteroid receptors in liver cytosol of the clawed toad, *Xenopus laevis*: Influence of thyroid and ovarian hormones. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**: 485-497.

LARRAS-REGARD, E., TAUROG, A. y DORRIS, M. (1981). Plasma  $T_4$  and  $T_3$  levels in *Ambystoma tigrinum* at various stages of metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**: 443-450.

LARSEN, P.R., SILVA, J.E. y KAPLAN, M.M. (1981). Relationship between circulating and intracellular thyroid hormones: Physiological and clinical implications. *Endocr. Rev.* **2**: 87-102.

LARSSON, M., PETTERSON, T. y CARLSTRÖM, A. (1985). Thyroid hormone binding in serum of 15 vertebrate species: isolation of thyroxine-binding globulin and prealbumin analogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 360-375.

LAZARUS, L.H. y ATTILA, M. (1993). The toad, ugly and venomous, wears yet a precious jewel in his skin. *Prog. Neurobiol.* **41**: 473-507.

LEATHERLAND, J.F. (1985). Effects of 17 $\beta$ -estradiol and methyl testosterone on the activity of the thyroid gland in rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. *Gen. Comp. Endocrinol.* **60**: 343-352.

LEATHERLAND, J.F. (1987). Thyroid hormones and reproduction. En: "Hormones and Reproduction in Fishes, Amphibians, and Reptiles". D.O. Norris, R.E. Jones (eds.). Plenum Press, New York, pp. 411-431.

LEATHERLAND, J.F. (1988). Endocrine factors affecting thyroid economy of teleost fish. *Amer. Zool.* **28**: 319-328.

LEATHERLAND, J.F., FARBRIDGE, K.J. y BOUJARD, T. (1992). Lunar and semi-lunar rhythms in fishes. En: "Rhythms in Fishes". NATO ASI Series. M.A. Ali (ed.). Plenum Press, New York. Vol. A236, pp. 83-107.

LEBEL, J.M. y LELOUP, J. (1992). La triiodothyronine est nécessaire à l'acclimatation à l'eau de mer de la truite fario (*Salmo trutta*) ou arc en ciel (*Oncorhynchus mykiss*). *C.R. Acad. Sci. Paris* **314**: 461-468.

LEBEL, J.M., L'HÉRAULT, S., DUSSAULT, J.H. y PUYMIRAT, J. (1993). Thyroid hormone up-regulates thyroid hormone receptor  $\beta$  gene expression in rat cerebral hemisphere astrocyte cultures. *Glia* **9**: 105-112.

LEBOULENGER, F., DELARUE, C., BELANGER, A., PERROTEAU, I., NETCHITAILO, P., LEROUX, P., JEGOU, S., TONON, M.C. y VAUDRY, H. (1982). Direct radioimmunoassay for plasma corticosterone and aldosterone in frog. I. Validation of the methods and evidence for daily rhythms in a natural environment. *Gen. Comp. Endocrinol.* **46**: 521-532.

LEDERIS, K. (1987). Non-mammalian corticotropin release-stimulating peptides. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* **512**: 129-138.

LEDERIS, K.P., OKAWARA, Y., RICHTER, D. y MORLEY, S.D. (1990). Evolutionary aspects of corticotropin releasing hormones. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. A. Epplé, C.G. Scanes, M.H. Stetson (eds.). Wiley-Liss, Inc., New York. Vol. 342, pp. 467-472.

LEER, L.M., CAMMENGA, M. y De VIJLDER, J.J.M. (1991). Methimazole and propylthiouracil increase thyroglobulin gene expression in FRTL-5 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **82**: R25-R30.

LELOUP, J. y BUSCAGLIA, M. (1977). La triiodothyronine, hormone de la métamorphose des amphibiens. *C. R. Acad. Sc., Paris* **284D**: 2261-2263.

LELOUP, J., BUSCAGLIA, M. y De LUZE, A. (1981). Modulation de la conversion de  $T_4$  en  $T_3$ . Aspects comparatifs. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **42**: 454-460.

LEONARD, J.L. y VISSER, T.J. (1986). Biochemistry of deiodination. En: "Thyroid Hormone Metabolism". G. Henneman (ed.). Marcel Dekker, New York. pp. 189-229.

LEROUX, P., TONON, M.C., STOECKEL, M.E., JÉGOU, S., LÉBOULENGER, F., DELARUE, C., PERROTEAU, I., NETCHITAÏLO, P., KUPRYSZEWSKI, G. y VAUDRY, H. (1983). Role of TRH in the control of melanotropin release in Amphibia. En: "Thyrotropin-Releasing Hormone". E.C. Griffiths, G.W. Bennett (eds.). Raven Press, New York, pp. 229-240.

LEWINSKI, A., WAJS, E. y KROTEWICZ, M. (1993). Melatonin and other indolic substances: Their influence on thyroid growth and secretion. En: "Melatonin and the Pineal Gland-From Basic Science to Clinical Application". Y. Touitou, J. Arendt, P. Pévet (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., pp. 265-268.

LICHT, P. (1994a). Thyroxine-binding protein represents the major vitamin D-binding protein in the plasma of the turtle, *Trachemys scripta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**: 82-92.

LICHT, P. (1994b). The relation of the dual thyroxine/vitamin D-binding protein (TBP/DBP) of Emydid turtles to vitamin D-binding proteins of other vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **94**: 215-224.

LICHT, P. y DENVER, R.J. (1988). Effects of TRH on hormone release from pituitaries of the lizard, *Anolis carolinensis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**: 355-362.

LICHT, P. y DENVER, R.J. (1990). Regulation of pituitary thyrotropin secretion. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. A. Epplé, C.G. Scanes, M.H. Stetson (eds.). Wiley-Liss, Inc., New York. Vol. 342, pp. 427-432.

LICHT, P. y PAVGI, S. (1992). Identification and purification of a high-affinity thyroxine binding protein that is distinct from albumin and prealbumin in the blood of a turtle, *Trachemys scripta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 179-192.

LICHT, P., BREITENBACH, G.L. y CONGDON, J.D. (1985a). Seasonal cycles in testicular activity, gonadotropin and thyroxine in the painted turtle, *Chrysemys picta*, under natural conditions. *Gen. Comp. Endocrinol.* **59**: 130-139.

LICHT, P., WOOD, J.F. y WOOD, F.E. (1985b). Annual and diurnal cycles in plasma testosterone and thyroxine in the male green sea turtle *Chelonia mydas*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 335-344.

LICHT, P., DENVER, R.J. y PAVGI, S. (1989). Temperature dependence of *in vitro* pituitary, testis, and thyroid secretion in a turtle, *Pseudemys scripta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 274-285.

LICHT, P., DENVER, R.J. y STAMPER, D.L. (1990a). Relation of plasma thyroxine binding to thyroidal activity and determination of thyroxine binding proteins in a turtle, *Pseudemys scripta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**: 238-256.

LICHT, P., PAVGI, S. y DENVER, R.J. (1990b). The role of hormone binding in the cold suppression of hormone stimulation of the pituitary, thyroid, and testis of the turtle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **80**: 381-392.

LICHT, P., DENVER, R.J. y HERRERA, B.E. (1991a). Comparative survey of blood thyroxine binding proteins in turtles. *J. Exp. Zool.* **259**: 43-52.

LICHT, P., DENVER, R.J., PAVGI, S. y HERRERA, B. (1991b). Seasonality in plasma thyroxine binding in turtles. *J. Exp. Zool.* **260**: 59-65.

LINTLOP, S.P. y YOUSON, J.H. (1983). Binding of triiodothyronine to hepatocyte nuclei from sea lampreys, *Petromyzon marinus* L., at various stages of the life cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**: 428-436.

LiVOLSI, V.A. (1992). Thyroid. En: "Histology for Pathologists". S.S. Sternberg (ed.). Raven Press, Ltd., New York. Cap. 14, pp. 301-310.

LONG, Y., FRANC, J.-L., KANIEWSKI, J., LANET, J. y GIRAUD, A. (1991). Effect of N-glycan removal on the enzymatic activity of porcine thyroid peroxidase. *Eur. J. Biochem.* **202**: 501-505.

LUPO, C., LODI, L., GIACOMA, C. y HALLIDAY, T.R. (1993). Testosterone binding sites in the brain, plasma sex hormones and reproductive behaviour in males of the toad *Bufo bufo*. *Behav. Process.* **30**: 93-102.

MACHUCA, I. y TATA, J.R. (1992). Autoinduction of thyroid hormone receptor during metamorphosis is reproduced in *Xenopus* XTC-2 cells. *Mol. Cell. Endocrinol.* **87**: 105-113.

MacKENZIE, D.S., LICHT, P. y PAPKOFF, H. (1978). Thyrotropin from amphibian (*Rana catesbeiana*) pituitaries and evidence for heterothyrotropic activity of bullfrog luteinizing hormone in reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **36**: 566-574.

MacLATCHY, D.L. y EALES, J.G. (1988). Short-term treatment with testosterone increases plasma 3,5,3'-triiodo-L-thyronine and hepatic L-thyroxine 5'-monodeiodinase levels in Arctic charr, *Salvelinus alpinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **71**: 10-16.

MacLATCHY, D.L. y EALES, J.G. (1992a). Properties of 5'-deiodinating systems in various tissues of the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 313-322.

MacLATCHY, D.L. y EALES, J.G. (1992b). Intra- and extra-cellular sources of T<sub>3</sub> binding to putative thyroid hormone receptors in liver, kidney, and gill nuclei of immature rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* **262**: 22-29.

MacLATCHY, D.L. y EALES, J.G. (1993). Effect of T<sub>3</sub> or T<sub>4</sub> challenge on inner- and outer-ring deiodination of T<sub>3</sub> and T<sub>4</sub> in the liver, kidney, and gill of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *J. Exp. Zool.* **265**: 637-645.

MAIER, C.E. y SINGER, M. (1982). Effect of limiting light to the pineal on the rate of forelimb regeneration in the newt. *J. Exp. Zool.* **219**: 111-114.

MAKSYMOWYCH, A.B., HSU, T.C. y LITWACK, G. (1993). A novel, highly conserved structural motif is present in all members of the steroid receptor superfamily. *Receptor* **2**: 225-240.

MALAGÓN, M.M., GARCÍA-NAVARRO, S., GARCÍA-HERDUGO, G. y GRACIA-NAVARRO, F. (1988). Immunocytochemical and morphometrical study of the thyrotropic cells of *Rana ridibunda*. *Histochemistry* **89**: 461-466.

MALAGÓN, M.M., GARCÍA-NAVARRO, S., RUIZ-NAVARRO, A. y GRACIA-NAVARRO, F. (1989). Morphometric evaluation of subcellular changes induced by *in vivo* TRH treatment in the pituitary gland of *Rana perezi*: Effects on prolactin and thyrotropic cells. *Cell Tissue Res.* **256**: 391-398.

MALAGÓN, M.M., RUIZ-NAVARRO, A., TORRONTERAS, R. y GRACIA-NAVARRO, F. (1991). Effect of ovine CRF on amphibian pituitary ACTH and TSH cells *in vivo*. A quantitative ultrastructural study. *Gen. Comp. Endocrinol.* **83**: 487-497.

MALLOL, J., OBREGÓN, M.J. y MORREALE de ESCOBAR, G. (1982). Analytical artifacts in radioimmunoassay of thyroxine in human milk. *Clin. Chem.* **28**: 1277-1282.

MALPAUX, B., DAVEAU, A., MAURICE, F., GAYRARD, V. y THIERY, J.C. (1993). Short-day effects of melatonin on luteinizing hormone secretion in the ewe: Evidence for central sites of action in the mediobasal hypothalamus. *Biol. Reprod.* **48**: 752-760.

MARRIQ, C., LEJEUNE, P.-J., VENOT, N. y VINET, L. (1991). Hormone formation in the isolated fragment 1-171 of human thyroglobulin involves the couple tyrosine 5 and tyrosine 130. *Mol. Cell. Endocrinol.* **81**: 155-164.

MARTIN, J.E., McKELLAR, S. y KLEIN, D.C. (1980). Melatonin inhibition of the *in vivo* pituitary response to luteinizing hormone-releasing hormone in the neonatal rat. *Neuroendocrinology* **31**: 13-17.

MASOOD-HUSSAIN, M. y SAIDAPUR, S.K. (1982). Effect of thiourea on the pituitary and thyroid gland of the toad, *Bufo melanostictus*. *J. Anim. Morphol. Physiol.* **29**: 64-70.

McEACHRON, D.L., LEVINE, J. y ADLER, N.T. (1990). Evidence that the pacemaker controlling activity rhythms is shortened in male thyroparathyroidectomized (TPX) rats: similarities to the effects of estradiol in females. *Prog. Clin. Biol. Res.* **341B**: 13-24.

McEACHRON, D.L. y SCHULL, J. (1993). Hormones, rhythms and the blues. En: "Hormonally Induced Changes in Mind and Brain". Academic Press, Inc.. Cap. 10, pp. 287-355.

McNABB, F.M.A. y FREEMAN, T.B. (1990). Comparative studies of thyroid hormone deiodinase systems. En: "Progress in Comparative Endocrinology". Progress in Clinical and Biological Research. A.Epple, C.G. Scanes, M.H. Stetson (eds.). Wiley-Liss, Inc., New York. Vol. 342, pp. 433-438.

MEEUWIS, R., MICHELSEN, R., DECUYPERE, E. y KÜHN, E.R. (1989). Thyrotropic activity of the ovine corticotropin-releasing factor in the chick embryo. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 357-363.

MERCKEN, L., SIMONS, M.J., SWILLENS, S., MASSET, M. y VASSART, G. (1985). Primary structure of bovine thyroglobulin-deduced from the sequence of the 8431-base complementary DNA. *Nature* **316**: 647-651.

MIDGLEY Jr., A.R., NISWENDER, G.D. y REBAR, R.W. (1969). Principles for the assessment of the reliability of radioimmunoassay methods (precision, accuracy, sensitivity, specificity). *Acta. Endocrinol. Suppl.* **142**: 163-180.

MIMNAGH, K.M., BOLAFFI, J.L., MONTGOMERY, N.M. y KALTENBACH, J.C. (1987). Thyrotropin-releasing hormone (TRH): Immunohistochemical distribution in tadpole and frog brain. *Gen. Comp. Endocrinol.* **66**: 394-404.

MITCHELL, M.A. y RAZA, A. (1986). The effects of glucagon and insulin on plasma thyroid hormone levels in fed and fasted domestic fowls. *Comp. Biochem. Physiol.* **85A**: 217-223.

MIYAUCHI, H., LaROCHELLE, F.T., SUZUKI, M., FREEMAN, M. y FRIEDEN, E. (1977). Studies on thyroid hormones and their binding in bullfrog tadpole plasma during metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **33**: 254-266.

MOCKEL, J., LAURENT, E., LEJEUNE, C. y DUMONT, J.E. (1991). Thyrotropin does not activate the phosphatidylinositol biphosphate hydrolizing phospholipase C in the dog thyroid. *Mol. Cell. Endocrinol.* **82**: 221-227.

MOL, K., KAPTEIN, E., DARRAS, V.M., De GREEF, W.J., KÜHN, E.R. y VISSER, T.J. (1993). Different thyroid hormone-deiodinating enzymes in tilapia (*Oreochromis niloticus*) liver and kidney. *FEBS Lett.* **321**: 140-144.

MOLITCH, M.E., REBAR, R.W. y BARSANO, C.P. (1993). Effect of human prolactin administration on gonadotropin and thyrotropin secretion in normal men. *J. Endocrinol. Invest.* **16**: 559-563.

- MONDOU, P.M. y KALTENBACH, J.C. (1979). Thyroxine concentrations in blood serum and pericardial fluid of metamorphosing tadpoles and of adult frogs. *Gen. Comp. Endocrinol.* **39**: 343-349.
- MONTGOMERY, N.M., FITE, K.V. y LI, Z. (1991). Anatomical evidence for an intergeniculate leaflet in *Rana pipiens*. *Neurosci. Lett.* **133**: 105-108.
- MOREL, G., ENJALBERT, A., PROULX, L., PELLETIER, G., BARDEN, N., GROSSARD, F. y DUBOIS, P.M. (1989). Effects of corticotropin-releasing factor on the release and synthesis of prolactin. *Neuroendocrinology* **49**: 669-675.
- MORICEAU-HAY, D., DOERR-SCHOTT, J. y DUBOIS, M.P. (1982). Immunohistochemical demonstration of TSH-, LH- and ACTH-cells in the hypophysis of tadpoles of *Xenopus laevis* D. *Cell Tissue Res.* **225**: 57-64.
- MORIN, P.P., HARA, T.J. y EALES, J.G. (1993). Thyroid hormone deiodination in brain, liver, gill, heart and muscle of Atlantic salmon (*Salmo salar*) during photoperiodically-induced parr-smolt transformation. I. Outer- and inner-ring thyroxine deiodination. *Gen. Comp. Endocrinol.* **90**: 142-156.
- MORIYA, T. (1983). The effect of temperature on the action of thyroid hormone and prolactin in larvae of the salamander *Hynobius retardatus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **49**: 1-7.
- MORIYA, T., THOMAS, C.R. y FRIEDEN, E. (1984). Increase in 3,5,3'-triiodothyronine (T<sub>3</sub>)-binding sites in tadpole erythrocyte nuclei during spontaneous and T<sub>3</sub>-induced metamorphosis. *Endocrinology* **114**: 170-175.
- MORLEY, J.E. (1981). Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. *Endocr. Rev.* **2**: 396-436.
- MOROVAT, A. y DAUNCEY, M.J. (1990). Changes in skeletal muscle 3,5,3'-triiodothyronine nuclear receptors with thyroid status are dependent on energy balance. *Horm. metabol. Res.* **22**: 128.
- MORREALE de ESCOBAR, G., PASTOR, R., OBREGÓN, M.J. y ESCOBAR del REY, F. (1985). Effects of maternal hypothyroidism on the weight and thyroid hormone content of rat embryonic tissues, before and after onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* **117**: 1890-1900.
- MORREALE de ESCOBAR, G., OBREGÓN, M.J., RUIZ De OÑA, C. y ESCOBAR del REY, F. (1988). Transfer of thyroxine from the mother to the rat fetus near term: effects on brain 3,5,3'-triiodothyronine deficiency. *Endocrinology* **122**: 1521-1531.
- MOSCONI, G., YAMAMOTO, K., CARNEVALI, O., NABISSI, M., POLZONETTI-MAGNI, A. y KIKUYAMA, S. (1994). Seasonal changes in plasma growth hormone and prolactin concentrations of the frog *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **93**: 380-387.

MOSKAITIS, J.E., SARGENT, T.D., SMITH Jr., L.H., PASTORI, R.L. y SCHOENBERG, D.R. (1989). *Xenopus laevis* serum albumin: Sequence of the complementary deoxyribonucleic acids encoding the 68- and 74-kilodalton peptides and the regulation of albumin gene expression by thyroid hormone during development. *Mol. Endocrinol.* **3**: 464-473.

MURAKAMI, M., TANAKA, K. y GREER, M.A. (1988). There is a nyctohemeral rhythm of type II iodothyronine 5'-deiodinase activity in rat anterior pituitary. *Endocrinology* **123**: 1631-1635.

MURPHY, H.M. y WIDEMAN, C.H. (1992). Vasopressin, corticosterone levels, and gastric ulcers during food-restriction stress. *Peptides* **13**: 373-376.

NAKAJIMA, K., UCHIDA, D., SAKAI, M., TAKAHASHI, N., YANAGISAWA, T., YAMAMOTO, K. y KIKUYAMA, S. (1993a). Thyrotropin-releasing hormone (TRH) is the major prolactin-releasing factor in bullfrog hypothalamus. *Gen. Comp. Endocrinol.* **89**: 11-16.

NAKAJIMA, K., YANAGISAWA, T., TANAKA, S. y KIKUYAMA, S. (1993b). Absence of methylated thyrotropin-releasing hormone in the bullfrog (*Rana catesbeiana*) brain. *Zool. Sci.* **10**: 711-714.

NG, W.C., WOLFFE, A.P. y TATA, J.R. (1984). Unequal activation by estrogen of individual *Xenopus* vitellogenin genes during development. *Dev. Biol.* **102**: 238-247.

NICOLAU, G.Y. y HAUS, E. (1992). Chronobiology of the hypothalamic-pituitary-thyroid axis. En: "Biologic Rhythms in Clinical and Laboratory Medicine". Y. Touitou, E. Haus (eds.). Springer-Verlag, Berlín, pp. 330-347.

NIEDZIELA, M. y LUKASZYK, A. (1993). Melatonin inhibits forskolin stimulated testosterone secretion by hamster Leydig cells in primary culture. En: "Melatonin and the Pineal Gland-From Basic Science to Clinical Application". Y. Touitou, J. Arendt, P. Pévet (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., pp. 285-288.

NIEUWKOOP, P.D. y FABER, J. (1967). Normal Table of *Xenopus laevis* (Daudin). 2ª Ed. North-Holland Publ. Company. Amsterdam.

NIINUMA, K., TAGAWA, M., HIRANO, T. y KIKUYAMA, S. (1991). Changes in tissue concentrations of thyroid hormones in metamorphosing toad larvae. *Zool. Sci.* **8**: 345-350.

NIKI, K., YOSHIZATO, K. y KIKUYAMA, S. (1981). Augmentation of nuclear binding capacity for triiodothyronine by aldosterone in tadpole tail. *Proc. Japan Acad.* **57B**: 271-275.

NIKI, K., NAMIKI, H., KIKUYAMA, S. y YOSHIZATO, K. (1982). Epidermal tissue requirement for tadpole tail regression induced by thyroid hormone. *Develop. Biol.* **94**: 116-120.



NIKI, K., YOSHIKATO, K., NAMIKI, H. y KIKUYAMA, S. (1984). *In vitro* regression of tadpole tail by thyroid hormone. *Develop. Growth and Differ.* **26**: 329-338.

NOESKE, T.A. y SPIELER, R.E. (1983). Photoperiod and diel variations of serum cortisol, thyroxine and protein in goldfish, *Carassius auratus* L. *J. Fish Biol.* **23**: 705-710.

NORRIS, D.O. (1983). Evolution of endocrine regulation of metamorphosis in lower vertebrates. *Amer. Zool.* **23**: 709-718.

NORRIS, D.O. (1985). *Vertebrate Endocrinology*. 2ª Ed.. Lea & Febiger, Philadelphia.

NORRIS, D.O. y DENT, J.N. (1989). Neuroendocrine aspects of amphibian metamorphosis. En: "Development, Maturation and Senescence of Neuroendocrine Systems: A Comparative Approach". C.G. Scanes, M.P. Schreibman (eds.). Academic Press, San Diego, pp. 63-90.

NORRIS, D.O. y DUVALL, D. (1981). Hormone-induced ovulation in *Ambystoma tigrinum*: influence of prolactin and thyroxine. *J. Exper. Zool.* **216**: 175-180.

NORRIS, D.O., DUVALL, D., GREENDALE, K. y GERN, W.A. (1977). Thyroid function in pre- and post-spawning neotenic tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **33**: 512-517.

NORRIS, D.O., GERN, W.A. y GREENDALE, K. (1981). Diurnal and seasonal variations in thyroid function of neotenic tiger salamanders (*Ambystoma tigrinum*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**: 134-137.

NUÑEZ, J. (1980). Iodination and thyroid hormone synthesis. En: "The Thyroid Gland". M. De Visscher (ed.). Raven Press, New York, pp. 39-50.

NYBROE, O., ROSENKILDE, P. y RYTTERSGAARD, L. (1985). Effects of hypophysectomy and substitution with growth hormone, prolactin, and thyroxine on growth and deposition in juvenile frogs, *Xenopus laevis*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 257-265.

OBREGÓN, M.J., PASCUAL, A., MORREALE de ESCOBAR, G. y ESCOBAR del REY, F. (1979). Pituitary and plasma thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine after hyperthyroidism. *Endocrinology* **104**: 1467-1473.

OBREGÓN, M.J., MALLOL, J., PASTOR, R.M., MORREALE de ESCOBAR, G. y ESCOBAR del REY, F. (1984). L-thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine in rat embryos before onset of fetal thyroid function. *Endocrinology* **114**: 305-307.

OBREGÓN, M.J., RUIZ de OÑA, C., CALVO, R., ESCOBAR del REY, F. y MORREALE de ESCOBAR, G. (1991). Outer ring iodothyronine deiodinases and thyroid hormone economy: Responses to iodine deficiency in the rat fetus and neonate. *Endocrinology* **129**: 2663-2673.

OKIMOTO, D.K., WEBER, G.M. y GRAU, E.G. (1993). The effects of thyroxine and propylthiouracil treatment on changes in body form associated with a possible developmental

thyroxine surge during post-hatching development of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*. *Zool. Sci.* **10**: 803-811.

OLIVERAU, M., LELOUP, J., de LUZE, A. y OLIVERAU, J. (1981). Effet de l'oestradiol sur l'axe hypophyso-thyroïdien de l'anguille. *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**: 352-363.

OLIVERAU, M., VANDESANDE, F., BOUCIQUE, E., OLLEVIER, F. y OLIVEREAU, J.M. (1987). Immunocytochemical localization and spatial relation to the adenohypophysis of a somatostatin-like and a corticotropin-releasing factor-like peptide in the brain of four amphibian species. *Cell Tissue Res.* **247**: 317-324.

OMELJANIUK, R.J. y EALES, J.G. (1985). Immersion of rainbow trout in 3,5,3'-triiodo-L-thyronine (T<sub>3</sub>): Effects on plasma T<sub>3</sub> levels and hepatic nuclear T<sub>3</sub> binding. *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 81-88.

OOMMEN, O.V. y SREEDEVIAKUMA, K.K. (1988). Influence of thyroid hormones and testosterone on the activities of hepatic mitochondrial enzymes in the Indian garden lizard, *Calotes versicolor*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 391-398.

OPPENHEIMER, J.H., SCHWARTZ, H.L., MARIASH, C.N., KINLAW, W.B., WONG, N.C.W. y FRAKE, H.C. (1987). Advances in our understanding of thyroid hormone action at the cellular level. *Endocr. Rev.* **8**: 288-308.

ORTIZ-CARO, J., GONZÁLEZ, C. y JOLIN, T. (1984). Diurnal variations of plasma growth hormone, thyrotropin, thyroxine, and triiodothyronine in streptozotocin-diabetic and food-restricted rats. *Endocrinology* **115**: 2227-2232.

OWENS, M.J. y NEMEROFF, C.B. (1991). Physiology and pharmacology of corticotropin-releasing factor. *Pharmacol. Rev.* **43**: 425-473.

PACKARD, G.C. y PACKARD, M.J. (1975). The influence of acclimation temperature on the metabolic response of frog tissue to thyroxine administration *in vivo*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **27**: 162-168.

PAGESY, P., CROISSANDEAU, G., Le DAFNIET, M., PEILLON, F. y LI, J.Y. (1992). Detection of thyrotropin-releasing hormone (TRH) mRNA by the reverse transcription-polymerase chain reaction in the human normal and tumoral anterior pituitary. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **182**: 182-187.

PAN, L. y GILBERT, F. (1992). Activation of 5-HT<sub>1A</sub> receptor subtype in the paraventricular nuclei of the hypothalamus induces CRH and ACTH release in the rat. *Neuroendocrinology* **56**: 797-802.

PANCAK, M.K. y TAYLOR, D.H. (1983). Seasonal and daily plasma corticosterone rhythms in American toads, *Bufo americanus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **50**: 490-497.

- PANG, S.F., SHIU, S.Y.W. y TSE, S.F. (1985). Effect of photic manipulation on the level of melatonin in the retina of the frogs (*Rana tigrina regulosa*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **58**: 464-470.
- PANZANELLI, P., MULATERO, B., LAZARUS, L.H. y FASOLO, A. (1991). Neuromedin B-like immunoreactivity in the brain of the green frog (*Rana esculenta* L.). *Eur. J. Bas. Appl. Histochem.* **35**: 359-370.
- PARROT, R.F. (1990). Central administration of corticotropin releasing factor in the pig: Effects on operant feeding, drinking and plasma cortisol. *Physiol. Behav.* **47**: 519-524.
- PEETERS, R., BUYS, N., VANMONTFORT, D., Van ISTERDAEL, J., DECUYPERE, E. y KÜHN, E.R. (1992). Preferential release of tri-iodothyronine following stimulation by thyrotrophin or thyrotrophin-releasing hormone in sheep of different ages. *J. Endocrinol.* **132**: 93-100.
- PEKARY, A.E., KNOBLE, M., GARCIA, N.H., BHASIN, S. y HERSHMAN, J.M. (1990). Testosterone regulates the secretion of thyrotrophin-releasing hormone (TRH) and TRH precursor in the rat hypothalamic-pituitary axis. *J. Endocrinol.* **125**: 263-270.
- PÉREZ-CAMPO, R., LÓPEZ-TORRES, M. y BARJA De QUIROGA, G. (1990). Thermal acclimation, hydroperoxide detoxifying enzymes and oxidative stress in the lung and liver of *Rana perezi*. *J. therm. Biol.* **15**: 193-199.
- PESCHKE, E., SCHÖN, M., TERTSCH, S., PESCHKE, D. y PEIL, J. (1989). Morphometric investigations of the pineal gland after ganglionectomy and thyroidectomy under the aspect of circadian and seasonal variations. *J. Hirnforsch.* **30**: 399-407.
- PETER, M.C.S. y OOMMEN, O.V. (1989). Oxidative metabolism in a teleost, *Anabas testudineus* Bloch: effect of thyroid hormones on hepatic enzyme activities. *Gen. Comp. Endocrinol.* **73**: 96-107.
- PICKERING, D.S. y NILES, L.P. (1990). Pharmacological characterization of melatonin binding sites in syrian hamster hypothalamus. *Eur. J. Pharmacol.* **175**: 71-77.
- PIERANTONI, R., VARRIALE, B., MINUCI, S., Di MATTEO, L., FASANO, S., D'ANTONIO, M. y CHIEFFI, G. (1986). Regulation of androgen production by frog (*Rana esculenta*) testis: an *in vitro* study on the effects exerted by estradiol, 5 $\alpha$ -dihydrotestosterone, testosterone, melatonin and serotonin. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**: 405-410.
- PIERCE, J.G. y PARSONS, T.F. (1981). Glycoprotein hormones: structure and function. *Ann. Rev. Biochem.* **50**: 465-495.
- PRATI, M., CALVO, R. y MORREALE DE ESCOBAR, G. (1992). L-thyroxine and 3,5,3'-triiodothyronine concentrations in the chicken egg and in the embryo before and after the onset of thyroid function. *Endocrinology* **130**: 2651-2659.

- PREECE, H. y LICHT, P. (1987). Effects of thyrotropin-releasing hormone *in vitro* on thyrotropin and prolactin release from the turtle pituitary. *Gen. Comp. Endocrinol.* **67**: 247-255.
- RABELO, E.M. y TATA, J.R. (1993). Thyroid hormone potentiates estrogen activation of vitellogenin genes and autoinduction of estrogen receptor in adult *Xenopus* hepatocytes. *Mol. Cell. Endocrinol.* **96**: 37-44.
- RANKIN, M.A. (1991). Endocrine effects on migration. *Amer. Zool.* **31**: 217-230.
- RASPÉ, E., LAURENT, E., ANDRY, G. y DUMONT, J.E. (1991). ATP, bradykinin, TRH and TSH activate the  $\text{Ca}^{2+}$ -phosphatidylinositol cascade of human thyrocytes in primary culture. *Mol. Cell. Endocrinol.* **81**: 175-183.
- RASTOGI, R.K. e IELA, L. (1980). Steroidogenesis and spermatogenesis in Anuran Amphibia: A breif survey. En: "Steroids and their Mechanism of Action in Nonmammalian Vertebrates". G. Delrio, J. Brocheta (eds.). New York, pp. 131-146.
- REDDING, J.M., PATIÑO, R. y SCHRECK, C.B. (1991). Cortisol effects on plasma electrolytes and thyroid hormones during smoltification in coho salmon *Oncorhynchus kisutch*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **81**: 373-382.
- REDJEM, M., VERDAGUER, M. y VIGOUROUX, E. (1990). Influence of chronic treatment with iopanoic acid on thyroxine metabolism in the newborn rat. *Horm. metab. Res.* **22**: 329-333.
- REGARD, E., TAUROG, A. y NAKASHIMA, T. (1978). Plasma thyroxine and triiodothyronine levels in spontaneously metamorphosing *Rana catesbeiana* tadpoles and in adult anuran Amphibia. *Endocrinology* **102**: 674-684.
- REICHLIN, S. (1986). Neuroendocrine control of thyrotropin secretion. En: "Werner's the Thyroid. A Fundamental and Clinical Text". S.H. Ingbar, L.E. Braverman (eds.). Lippincott Press, Philadelphia. 5ª Ed., pp. 241-266.
- REITER, R.J. (1987). Mechanisms of control of reproductive physiology by the pineal gland and its hormones. En: "Advances in Pineal Research". R.J. Reiter, F. Fraschini (eds.). John Libbey & Co. Ltd., London. Vol. 2, pp. 109-125.
- REITER, R.J. (1991a). Pineal gland, interface between the photoperiodic environment and the endocrine system. *Trends Endocrin. Met.* **2**: 13-19.
- REITER, R.J. (1991b). Pineal melatonin: cell biology of its synthesis and of its physiological interactions. *Endocr. Rev.* **12**: 151-180.
- REITER, R.J. (1991c). Melatonin: that ubiquitously acting pineal hormone. *News Physiol. Sci.* **6**: 223-227.

RENGEL, D. y PISANO, A. (1990). La gónada larval de *Bufo arenarum* sometida a hormona tiroidea. *Rev. Fac. Cien. Med. Univ. Nac. Córdoba* **48**: 7-12.

REMY, C. y DISCLOS, P. (1970). Influence de l'épiphysectomie sur le développement de la thyroïde et des gonades chez les têtards d'*Alytes obstetricans*. *C.R. Soc. Biol.* **164**: 1989-1993.

RETTORI, V., MILENKOVIC, L., FAHIM, A.M., POLAK, J., BLOOM, S.R. y McCANNIS, S. (1989). Role of Neuromedin B in the control of the release of thyrotropin in the rat. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **86**: 4789-4792.

RICHARDS, C.M. y NACE, G.W. (1978). Gynogenetic and hormonal sex reversal used in tests of the XX-XY hypothesis of sex determination in *Rana pipiens*. *Growth* **42**: 319-331.

RICHTER, M.N. y McCARTY, K.S. (1954). Anisotropic crystals in the human thyroid gland. *Am. J. Pathol.* **30**: 545-553.

RIEGEL, A.T., MARTIN, M.B., SCHOENBERG, D.R. (1986). Transcriptional and posttranscriptional inhibition of albumin gene expression by estrogen in *Xenopus* liver. *Mol. Cell. Endocrinol.* **44**: 201-209.

RINTAMÄKI, H., HISSA, R., ETCHES, R.J., SCANES, C.G., BALTHAZART, J. y SAARELA, S. (1986). Seasonal changes in some plasma hormones in pigeons: diurnal variation under natural photoperiods with constant or seasonally changing ambient temperature. *Comp. Biochem. Physiol.* **84A**: 33-38.

RIVIER, C.L. y PLOTSKY, P.M. (1986). Mediation by corticotropin-releasing factor (CRF) of adenohipophysial hormone secretion. *Annu. Rev. Physiol.* **48**: 475-494.

ROBBINS, J. y EDELHOCH, H. (1986). Thyroid hormone transport proteins, their nature biosynthesis and metabolism. En: "Werner's the Thyroid. A Fundamental and Clinical Text". S.H. Ingbar, L.E. Braverman (eds.). Lippincott Press, Philadelphia. 5ª Ed., pp. 116-127.

ROBINSON, H. (1977). Amphibian metamorphosis: studies on the mechanisms of action of thyroid hormone. En: "Thyroid Hormones and Brain Development". G.D. Grave (ed.). Raven Press, New York. Cap. 9, pp. 137-150.

RODRÍGUEZ, F. y JOLIN, T. (1991). The role of somatostatine and/or dopamine in basal and TRH-stimulated TSH release in food-restricted rats. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **125**: 186-191.

RODRÍGUEZ, M., RODRÍGUEZ, F. y JOLIN, T. (1992). Effect of restricted feeding, fasting, and diabetes on the relationship between thyroid hormone receptor occupancy, growth hormone induction, and inhibition of thyrotropin release in thyroidectomized rats. *Endocrinology* **131**: 1612-1618.

ROLLAG, M.D. y LYNCH, G.R. (1993). Melatonin-induced desensitization in amphibian melanophores. *J. Exp. Zool.* **265**: 488-495.

- ROLLAND, M., AQUARON, R. y LISSITZKY, S. (1970). Thyroglobulin iodoamino acids estimation after digestion with pronase and leucylaminopeptidase. *Anal. Biochem.* **33**: 307-317.
- ROME, L.C., STEVENS, E.D. y JOHN-ALDER, H.B. (1992). The influence of temperature and thermal acclimation on physiological function. En: "Environmental Physiology of the Amphibians". M.E. Feder, W.W. Burggren (eds.). The University of Chicago Press, Chicago/London. Cap. 8, pp. 183-205.
- RONDEEL, J.M.M., de GREEF, W.J., KLOOTWIJK, W. y VISSER, T.J. (1992). Effects of hypothyroidism on hypothalamic release of thyrotropin-releasing hormone in rats. *Endocrinology* **130**: 651-656.
- ROSENKILDE, P. (1979). The thyroid hormones in Amphibia. En: "Hormones and Evolution". E.J.W. Barrington (ed.). Academic Press, New York. Vol. 1, pp. 437-491.
- ROSENKILDE, P. (1982). The role of thyroid hormones in adult amphibians. En: "Phylogenetic Aspects of Thyroid Hormone Actions". Institute of Endocrinology, Gunma University (ed.). Center for Academic Publications, Tokyo. Vol. 19, pp. 91-106.
- ROSENKILDE, P. (1985). The role of hormones in the regulation of amphibian metamorphosis. En: "Metamorphosis". M. Balls, M. Bownes (eds.). Clarendon Press, Oxford. Cap. 13, pp. 221-259.
- ROSENKILDE, P. y JØRGENSEN, I. (1977). Determination of serum thyroxine in two species of toads: variation with season. *Gen. Comp. Endocrinol.* **33**: 566-573.
- ROSENKILDE, P. y USSING, A.P. (1990). Regulation of metamorphosis. En: "Biology and Physiology of Amphibians". Progress in Zoology. W. Hanke (ed.). Gustav Fisher Verlag, Stuttgart/New York. Vol 38, pp. 125-138.
- ROSENKILDE, P., MOGENSEN, E., CENTERVALL, G. y JØRGENSEN, O.S. (1982). Peaks of neuronal membrane antigen and thyroxine in larval development of the mexican axolotl. *Gen. Comp. Endocrinol.* **48**: 504-514.
- ROUSSET, B.A.F. (1991). Trafic intracellulaire et clivage protéolytique de la thyroglobuline, la prohormone thyroïdienne. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **52**: 355-360.
- ROUSSET, B. y MORNEX, R. (1991). The thyroid hormone secretory pathway-current dogmas and alternative hypotheses. *Mol. Cell. Endocrinol.* **78**: C89-C93.
- RUIZ DE OÑA, C., MORREALE DE ESCOBAR, G., CALVO, R.M., ESCOBAR DEL REY, F. y OBREGÓN, M.J. (1991). Thyroid hormone and 5'-deiodinase in the rat fetus late in gestation. Effects of maternal hypothyroidism. *Endocrinology* **128**: 422-432.
- SAAD, A.H. y ALI, W. (1992). Seasonal changes in humoral immunity and blood thyroxine levels in the toad, *Bufo regularis*. *Zool. Sci.* **9**: 349-356.

SAAD, M.B. y BAYLÉ, J.-D. (1985). Seasonal changes in plasma testosterone, thyroxine, and cortisol levels in wild rabbits (*Oryctolagus cuniculus algirus*) of Zembra island. *Gen. Comp. Endocrinol.* **57**: 383-388.

SAARELA, S., HISSA, R., ETCHES, R., BALTHAZART, J. y RINTAMÄKI, H. (1986). Seasonal changes in some plasma hormones in pigeons from different environments. *Comp. Biochem. Physiol.* **84A**: 25-31.

SAFRAN, M. y LEONARD, J.L. (1991). Comparison of the physicochemical properties of type-I and type-II iodothyronine 5'-deiodinase. *J. Biol. Chem.* **266**: 3233-3238.

SAFRAN, M., FARWELL, A.P. y LEONARD, J.L. (1991). Evidence that type II 5'-deiodinase is not a selenoprotein. *J. Biol. Chem.* **266**: 13477-13480.

SAIDAPUR, S.K. y MASOOD-HUSSAIN, M. (1986). Effect of thiourea on pituitary *pars distalis* and thyroid gland of the frog *Rana cyanophlyctis* (SCHN). *J. Karnatak Univ. (Science)* **31**: 144-150.

SAKAI, M., TAKASU, H., KIKUYAMA, S., HAYASHI, H., TANAKA, S. y HANAOKA, Y. (1987). Purification and characterization of bullfrog thyrotropin. En: "Proceedings of the First Congress of the Asia and Oceania Society for Comparative Endocrinology (AOSCE)". E. Ohnishi, Y. Nagahama, H. Ishizaki (eds.). Nagoya, pp. 47-48.

SAKAI, M., UCHIDA, D., YANAGISAWA, T. y KIKUYAMA, S. (1991a). Effects of thyrotropin-releasing hormone analogues and metabolites on prolactin release from the bullfrog hypophysis. *Zool. Sci.* **8**: 935-937.

SAKAI, M., HANAOKA, Y., TANAKA, S., HAYASHI, H. y KIKUYAMA, S. (1991b). Thyrotropic activity of various adenohypophyseal hormones of the bullfrog. *Zool. Sci.* **8**: 929-934.

SALLEH, M., ARDAWI, M. y KHOJA, S.M. (1993). Effects of hyperthyroidism on glucose, glutamine and ketone-body metabolism in the gut of the rat. *Int. J. Biochem.* **25**: 619-624.

SAMUELS, H.H., PERLMAN, A.J., RAAKA, B.M. y STANLEY, F. (1982). Organization of the thyroid hormone receptor in chromatin. *Rec. Progr. Horm. Res.* **38**: 557-599.

SAMUELS, M.H., VELDHUIS, J.D., HENRY, P. y RIDGWAY, E.C. (1990). Pathophysiology of pulsatile and copulsatile release of thyroid-stimulating hormone, luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and alpha-subunit. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* **71**: 425-432.

SAMUELS, M.H., HENRY, P. y RIDGWAY, E.C. (1992). Effects of dopamine and somatostatin on pulsatile pituitary glycoprotein secretion. *Endocrinology* **74**: 217-222.

SANTINI, F., CHOPRA, I.J., WU, S.-Y., SOLOMON, D.H. y CHUA TECO, G.N. (1992). Metabolism of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate by tissues of the fetal rat: a consideration of desulfation of 3,5,3'-triiodothyronine sulfate as a source of T<sub>3</sub>. *Pediatr. Res.* **31**: 541-544.

SARKAR, H.B.D. y RAO, M.A. (1969). Effect of thiourea on ovulation *in vitro* in the skipper frog, *Rana cyanophlyctis* (Schn). *Acta Endocrinol.* **60**: 173-176.

SARKAR, H.B.D. y RAO, M.A. (1971). Effect of thyroidectomy and administration of thyroxine on ovulation and spawning *in vivo*, *in vitro* and in transplantation in the skipper frog, *Rana cyanophlyctis* (Schn). *Gen. Comp. Endocrinol.* **16**: 594-598.

SATOH, T., FENG, P., KIM, U.J. y WILBER, J.F. (1993). Identification of thyrotropin-releasing hormone receptor messenger RNA in the rat central nervous system and eye. *Mol. Brain Res.* **19**: 175-178.

SAWIN, C.T., BOLAFFI, J.L., BACHARACH, P. y LANCE, V. (1981a). Conversion of thyroxine to triiodothyronine in an adult amphibian, *Bufo marinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **43**: 17-19.

SAWIN, C.T., BACHARACH, P. y LANCE, V. (1981b). Thyrotropin-releasing hormone and thyrotropin in the control of thyroid function in the turtle, *Chrysemys picta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**: 7-11.

SCAMMEL, J.C., BARNEY, C.C. y FREGLY, M.J. (1981). Proposed mechanism for increased thyroxine deiodination in cold-acclimated rats. *J. Appl. Physiol.* **51**: 1157-1161.

SCAPIN, S. e INCERPI, S. (1992). Annual variations in the binding of insulin to hepatic membranes of the frog *Rana esculenta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 128-137.

SCHLATT, S., NIKLOWITZ, P., HOFFMANN, K. y NIESCHLAG, E. (1993). Influence of short photoperiods on reproductive organs and estrous cycles of normal and pinealectomized female djungarian hamsters, *Phodopus sungorus*. *Biol. Reprod.* **49**: 243-250.

SCHNEIDER, M.J. y GALTON, V.A. (1991). Regulation of c-erbA- $\alpha$  messenger RNA species in tadpole erythrocytes by thyroid hormone. *Mol. Endocrinol.* **5**: 201-208.

SCHOENMAKERS, C.H.H., PIGMANS, I.G.A.J. y VISSER, T.J. (1992). Species differences in liver type I iodothyronine deiodinase. *Biochim. Biophys. Acta* **1121**: 160-166.

SCHÖNENBERGER, N. y ESCHER, G. (1988). Excessive numbers of axons after early enucleation and blockade of metamorphosis in the oculomotor nerve of *Xenopus laevis*. *Dev. Brain Res.* **40**: 253-260.

SCHRÖDER-Van Der ELST, J.P. y Van Der HEIDE, D. (1992). Effects of streptozocin-induced diabetes and food restriction on quantities and source of T<sub>4</sub> and T<sub>3</sub> in rat tissues. *Diabetes* **41**: 147-152.



- SCHULTHEISS, H. (1980).  $T_3$  and  $T_4$  concentrations during metamorphosis of *Xenopus laevis* and *Rana esculenta* and in the neotenic Mexican Axolotl. *Gen. Comp. Endocrinol.* **40**: 372.
- SCHWARTZ, J. y CHERNY, R. (1992). Intercellular communication within the anterior pituitary influencing the secretion of hypophysial hormones. *Endocr. Rev.* **13**: 453-475.
- SECHMAN, A. y BOBEK, S. (1988). Presence of iodothyronines in the yolk of the hen's egg. *Gen. Comp. Endocrinol.* **69**: 99-105.
- SEKI, T. y KIKUYAMA, S. (1986a). Effect of thyrotropin releasing hormone and dopamine on the *in vitro* secretion of prolactin by the bullfrog pituitary gland. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**: 197-202.
- SEKI, T. y KIKUYAMA, S. (1986b). Possible involvement of thyrotropin-releasing hormone in the release of prolactin from the hypophysis of the bullfrog. En: "*Pars Distalis of the Pituitary Gland-Structure, Function and Regulation*". F. Yoshimura, A. Gorbman (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., New York/Tokyo, pp. 247-249.
- SEKI, T., NAKAI, Y., SHIODA, S., MITSUMA, T. y KIKUYAMA, S. (1983). Distribution of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone in the forebrain and hypophysis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Cell Tissue Res.* **233**: 507-516.
- SEKI, T., KIKUYAMA, S. y SUZUKI, M. (1988). Effect of hypothalamic extract on the prolactin release from the bullfrog pituitary gland with special reference to thyrotropin-releasing hormone (TRH). *Zool. Sci.* **5**: 407-413.
- SEN, S. y BHATTACHARYA, S. (1981). Role of thyroxine & gonadotropins on the mobilization of ovarian cholesterol in a teleost *Anabas testudineus* (Bloch). *Indian J. Exp. Biol.* **19**: 408-412.
- SERRANO-LOZANO, A., MONTIEL, M., MORELL M. y MORATA, P. (1993). 5'-deiodinase activity in brain regions of adult rats: Modifications in different situations of experimental hypothyroidism. *Brain Res. Bull.* **30**: 611-616.
- SHARIF, N.A. (1987). Adaptive changes in brain and pituitary TRH receptors: Effects of lesions, kindling hormones, drugs, and other factors. *Med. Sci. Res.* **15**: 223-237.
- SHI, Y.B. y BROWN, D.D. (1993). The earliest changes in gene expression in tadpole intestine induced by thyroid hormone. *J. Biol. Chem.* **268**: 20312-20317.
- SHI, Z.X., LEVY, A. y LIGHTMAN, S.L. (1994). Thyroid hormone-mediated regulation of corticotropin-releasing hormone messenger ribonucleic acid in the rat. *Endocrinology* **134**: 1577-1580.

SHIBATA, N., YOSHINUKI, M. y NAGAHAMA, Y. (1993). Vitellogenin incorporation into oocytes of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*, *in vitro*: effect of hormones on denuded oocytes. *Develop. Growth & Differ.* **35**: 115-121.

SHIELDS, C.A. y EALES, J.G. (1986). Thyroxine 5'-deiodinase activity in hepatocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri*: Distribution, effects of starvation, and exogenous inhibitors. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 334-343.

SHUPNIK, M.A., CHIN, W.W. y RIDGWAY, E.C. (1989a). T<sub>3</sub> regulation of TSH gene expression. *Endocr. Res.* **15**: 579-599.

SHUPNIK, M.A., RIDGWAY, E.C. y CHIN, W.W. (1989b). Molecular biology of thyrotropin. *Endocr. Rev.* **10**: 459-475.

SIDLOWSKI, J.J. y FRIEDEN, E. (1982). Triiodothyronine induces an increase in cyclic GMP in bullfrog tadpole tissues. *Bioscience Rep.* **2**: 569-573.

SIEVERT, L.M. (1991). Thermoregulatory behaviour in the toads *Bufo marinus* and *Bufo cognatus*. *J. therm. Biol.* **16**: 309-312.

SILVA, J.E. y LARSEN, J.E. (1983). Adrenergic activation of triiodothyronine production in brown adipose tissue. *Nature* **305**: 712-713.

SINSCH, U. (1984). Thermal influences on the habitat preference and the diurnal activity in three European *Rana* species. *Oecologia* **64**: 125-131.

SKENE, D.J., VIVIEN-ROELS, B. y PÉVET, P. (1991). Day and nighttime concentrations of 5-methoxytryptophol and melatonin in the retina and pineal gland from different classes of vertebrates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**: 405-411.

SKENE, D.J., RAYNAUD, F. y PÉVET, P. (1993). Melatonin and 5-methoxytryptophol binding sites in the retina. En: "Melatonin and the Pineal Gland-From Basic Science to Clinical Application". Y. Touitou, J. Arendt, P. Pévet (eds.). Elsevier Science Publishers B.V., pp. 87-94.

SOKAL, R.R. y ROHLF, F.J. (1979). Biometría. Principios y métodos estadísticos en la investigación biológica. Ediciones Blume, Madrid.

SPECKER, J.L., BROWN, C.L. y BERN, H.A. (1992). Asynchrony of changes in tissue and plasma thyroid hormones during the parr-smolt transformation of coho salmon. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**: 397-405.

SPIELER, R.E. (1992). Feeding-entrained circadian rhythms. En: "Rhythms in Fishes". NATO ASI Series. M.A. Ali (ed.). Plenum Press, New York. Vol A236, pp. 137-147.

SPIELER, R.E. y NOESKE, T.A. (1984). Effects of photoperiod and feeding schedule on diel variations of locomotor activity, cortisol, and thyroxine in goldfish. *Trans. Amer. Fish. Soc.* **113**: 528-539.

SPIRA, O. y GORDON, A. (1986). Thyroid hormone feedback effects on thyroid-stimulating hormone. En: "Thyroid Hormone Metabolism". G. Hennemann (ed.). Marcel Dekker, New York, pp. 535-578.

SPIRO, M.J. y SPIRO, R.G. (1985). Synthesis and processing of thyroglobulin carbohydrate units. En: "Thyroglobulin-The Prothyroid Hormone". Progress in Endocrine Research and Therapy. M.C. Eggo, G.N. Burrow (eds.). Raven Press, New York. Vol. 2, pp. 103-113.

St. AUBIN, D.J. y GERACI, J.R. (1989). Seasonal variation in thyroid morphology and secretion in the white whale, *Delphinapterus leucas*. *Can. J. Zool.* **67**: 263-267.

STAMPER, D.L., DENVER, R.J. y LICHT, P. (1990). Effects of thyroidal status on metabolism and growth of juvenile turtles, *Pseudemys scripta elegans*. *Comp. Biochem. Physiol.* **96A**: 67-73.

STENZEL-POORE, M.P., HELDWEIN, K.A., STENZEL, P., LEE, S. y VALE, W.W. (1992). Characterization of the genomic corticotropin-releasing factor (CRF) gene from *Xenopus laevis*: two members of the CRF family exist in amphibians. *Mol. Endocrinol.* **6**: 1716-1724.

STIEFF, C.L. y KALTENBACH, J.C. (1986). Immunofluorescent detection and localization of thyroxine in blood of adult amphibians. *Gen. Comp. Endocrinol.* **64**: 419-427.

STRYJEK-KAMINSKA, D., LOOS, U., MAIER, V., DITSCHUNEIT, H.H. y PFEIFFER, E.F. (1988). Seasonal variations of glucose and triiodothyronine concentrations in serum of carp (*Cyprinus carpio* L.). *Horm. metabol. Res.* **20**: 727-729.

SUGDEN, D. (1991). Aggregation of pigment granules in single cultured *Xenopus laevis* melanophores by melatonin analogues. *Br. J. Pharmacol.* **104**: 922-927.

SULLIVAN, C.V., DARLING, D.S. y DICKHOFF, W.W. (1987). Nuclear receptors for L-triiodothyronine in trout erythrocytes. *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**: 149-160.

SULLIVAN, C.V., BERNARD, M.G., HARA, A. y DICKHOFF, W.W. (1989). Thyroid hormones in trout reproduction: Enhancement of gonadotropin-releasing hormone analogue and partially purified salmon gonadotropin-induced ovarian maturation *in vivo* and *in vitro*. *J. Exp. Zool.* **250**: 188-195.

SUZUKI, S. (1992). Thyroid gland. En: "Atlas of Endocrine Organs. Vertebrates and Invertebrates". A. Matsumoto, S. Ishii (eds.). Springer-Verlag, Berlín. Cap. 4, pp. 63-72.

SUZUKI, S. y SUZUKI, M. (1981). Changes in thyroidal and plasma iodine compounds during and after metamorphosis of the bullfrog, *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **45**: 74-81.

SUZUKI, M.R. y KIKUYAMA, S. (1983). Corticoids augment nuclear binding capacity for triiodothyronine in bullfrog tadpole tail fins. *Gen. Comp. Endocrinol.* **52**: 272-278.

SUZUKI, S. y FUJIKURA, K. (1994). Circulating thyroglobulin in tadpoles and adult frogs of *Rana catesbeiana*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **94**: 72-77.

SWEETING, R.M. y EALES, J.G. (1992a). HPLC analysis of *in vitro* hepatic deiodination products of thyroid hormones in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 367-375.

SWEETING, R.M. y EALES, J.G. (1992b). The acute influence of ingested thyroid hormones on hepatic deiodination pathways in the rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 376-384.

SWEETING, R.M. y EALES, J.G. (1992c). Thyroxine 5'-monodeiodinase activity in microsomes from isolated hepatocytes of rainbow trout: Effects of growth hormone and 3,5,3'-triiodo-L-thyronine. *Gen. Comp. Endocrinol.* **88**: 169-177.

TAGAWA, M. y HIRANO, T. (1987). Presence of thyroxine in eggs and changes in its content during early development of chum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**: 129-135.

TAGAWA, M., MIWA, S., INUI, Y., De JESUS, E.G. y HIRANO, T. (1990). Changes in thyroid hormone concentrations during early development and metamorphosis of the flounder, *Paralichthys olivaceus*. *Zool. Sci.* **7**: 93-96.

TAKADA, M. y HARA, K. (1988). T<sub>3</sub>-induced differentiation of the electromotive force related to active Na transport across the skin of the neotenus urodele, *Ambystoma mexicanum*. *Comp. Biochem. Physiol.* **89A**: 157-161.

TANAKA, K., MURAKAMI, M. y GREER, M.A. (1987). Rhythmicity of triiodothyronine generation by type II thyroxine 5'-deiodinase in rat pineal is mediated by a  $\beta$ -adrenergic mechanism. *Endocrinology* **121**: 74-77.

TANAKA, S., PARK, M.K., HAYASHI, H., HANAOKA, Y., WAKABAYASHI, K. y KUROSUMI, K. (1990). Immunocytochemical localization of the subunits of glycoprotein hormones (LH, FSH, and TSH) in the bullfrog pituitary gland using monoclonal antibodies and polyclonal antiserum. *Gen. Comp. Endocrinol.* **77**: 88-97.

TANAKA, S., SAKAI, M., PARK, M.K. y KUROSUMI, K. (1991). Differential appearance of the subunits of glycoprotein hormones (LH, FSH, and TSH) in the pituitary of bullfrog (*Rana catesbeiana*) larvae during metamorphosis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **84**: 318-327.

TANAKA, S., MIZUTANI, F., YAMAMOTO, K., KIKUYAMA, S. y KUROSUMI, K. (1992). The alpha-subunit of glycoprotein hormones exists in the prolactin secretory granules of the bullfrog (*Rana catesbeiana*) pituitary gland. *Cell Tissue Res.* **267**: 223-231.

TANIGUCHI, Y., TANAKA, S. y KUROSUMI, K. (1990). Distribution of immunoreactive thyrotropin-releasing hormone in the brain and hypophysis of larval bullfrogs with special reference to nerve fibers in the *pars distalis*. *Zool. Sci.* **7**: 427-433.

TASAKI, Y. e ISHII, S. (1990a). Effects of thyroidectomy, hypophysectomy, temperature and humidity on the occurrence of nocturnal locomotor activity in the toad, *Bufo japonicus*, during the breeding season. *Zool. Sci.* **7**: 97-103.

TASAKI, Y. e ISHII, S. (1990b). Effects of thyroxine on locomotor activity and carbon dioxide release in the toad, *Bufo japonicus*. *Zool. Sci.* **7**: 249-256.

TASAKI, Y., INOUE, M. e ISHII, S. (1986). Annual cycle of plasma thyroid hormone levels in the toad, *Bufo japonicus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **62**: 404-410.

TATA, J.R. (1960). The partial purification and properties of thyroxine dehalogenase. *Biochem. J.* **77**: 214-226.

TATA, J.R., KAWAHARA, A. y BAKER, B.S. (1991). Prolactin inhibits both thyroid hormone-induced morphogenesis and cell death in cultured amphibian larval tissues. *Dev. Biol.* **146**: 72-80.

TAUROG, A. (1979). Hormone synthesis. En: "Endocrinology". L.J. DeGroot (ed.). Grune & Stratton, New York. Vol. 1, pp. 331-334.

TAUROG, A., DORRIS, M.L., GUZIEC Jr., F.S. y UETRECHT, J.P. (1989). Metabolism of <sup>35</sup>S- and <sup>14</sup>C-labeled propylthiouracil in a model *in vitro* system containing thyroid peroxidase. *Endocrinology* **124**: 3030-3037.

TAYLOR, A.C. y KOLLROS, J.J. (1946). Stages in the normal development of *Rana pipiens* larvae. *Anat. Rec.* **94**: 7-23.

TAYLOR, J.A. y BOYD, S.K. (1991). Thyrotropin-Releasing Hormone facilitates display of reproductive behavior and locomotor behavior in an amphibian. *Horm. Behav.* **25**: 128-136.

TAYLOR, T., WONDISFORD, F.E., BLAINE, T. y WEINTRAUB, B.D. (1990). The paraventricular nucleus of the hypothalamus has a major role in thyroid hormone feedback regulation of thyrotropin synthesis and secretion. *Endocrinology* **126**: 317-324.

TEGLER, L., ERICSSON, U.-B., GILLQUIST, J. y LINDVALL, R. (1993). Basal and thyrotropin-stimulated secretion rates of thyroglobulin from the human thyroid gland during surgery. *Thyroid* **3**: 213-217.

TERZOLO, M., PIOVESAN, A., OSELLA, G., TORTA, M., BUNIVA, T., PACCOTTI, P., WIERDIS, T. y ANGELI, A. (1991). Exogenous melatonin enhances the TRH- induced prolactin release in normally cycling women: a sex-specific effect. *Gynecol. Endocrinol.* **5**: 83-94.

TERZOLO, M., REVELLI, A., GUIDETTI, D., PIOVESAN, A., CASSONI, P., PACCOTTI, P., ANGELI, A. y MASSOBRIO, M. (1993). Evening administration of melatonin enhances the pulsatile secretion of prolactin but not of LH and TSH in normally cycling women. *Clin. Endocrinol.* **39**: 185-191.

THAKARE, U.R., KARIR, T., JOSEPH, L. y SAMUEL, A.M. (1993). Iodothyronine 5'-deiodinase activity (5'-D) in liver and brain during induction of hypothyroidism in adult rats. *Med. Sci. Res.* **21**: 201-202.

THOMAS, C.R., DRAKE, J. y FRIEDEN, E. (1992). Thyroid hormone receptor induction by triiodothyronine in tadpole erythrocytes *in vivo* and *in vitro* and the effect of cycloheximide and actinomycin-D. *Gen. Comp. Endocrinol.* **86**: 42-51.

TONG, W., KERKOF, P. y CHIAKOFF, I.L. (1962). Identification of labelled thyroxine and triiodothyronine in amphioxus treated with <sup>131</sup>I. *Biochim. Biophys. Acta* **561**: 326-331.

TONON, M.C., CUET, P., LAMACZ, M., JEGOU, S., COTE, J., GOUTEUX, L., LING, N., PELLETIER, G. y VAUDRY, H. (1986). Comparative effects of corticotropin-releasing factor, arginine, vasopressin, and related neuropeptides on the secretion of ACTH and  $\alpha$ -MSH by frog anterior pituitary cells and neurointermediate lobes *in vitro*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **61**: 438-445.

TOTH, E. y TABACKNICK, M. (1979). *In vivo* demonstration of the presence of specific saturable binding sites for triiodothyronine in nuclei of tadpole liver. *Gen. Comp. Endocrinol.* **38**: 345-355.

TRINDER, P. (1969). *Ann. Clin. Biochem.* **6**: 24-33.

UCHIYAMA, Y., MURAKAMI, G. y OHNO Y. (1985). The fine structure of nerve endings on rat thyroid follicular cells. *Cell. Tissue Res.* **242**: 457-460.

UNDERWOOD, H. (1988). Circadian organization in lizards: perception, translation, and transduction of photic and thermal information. En: "Processing of Environmental Information in Vertebrates". M.H. Stetson (ed.). Springer-Verlag, New York. Cap. 3, pp. 47-70.

UNDERWOOD, H. (1990). The pineal and melatonin: Regulators of circadian function in lower vertebrates. *Experientia* **46**: 120-128.

UEDA, H., HIROI, O., HARA, A., YAMAUCHI, K. y NAGAHAMA, Y. (1984). Changes in serum concentrations of steroid hormones, thyroxine, and vitellogenin during spawning migration of the shum salmon, *Oncorhynchus keta*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **53**: 203-211.

Van HERLE, A.J. (1985). Circulating thyroglobulin in thyroid cancer. En: "Thyroglobulin-the prothyroid hormone". Progress in Endocrine Research and Therapy. M.C. Eggo, G.N. Burrow (eds.). Raven Press, New York. Vol. 2, pp. 317-323.

Van HERLE, A.J., VASSARI, G. y DUMONT, J.E. (1979). Control of thyroglobulin synthesis and secretion. *N. Engl. J. Med.* **301**: 239-249, 307-314.

VANDORPE, G. y KÜHN, E.R. (1989). Estradiol-17 $\beta$  silastic implants in female *Rana ridibunda* depress thyroid hormone concentration in plasma and the *in vitro* 5'-monodeiodination activity of kidney homogenates. *Gen. Comp. Endocrinol.* **76**: 341-345.

VANDORPE, G., JACOBS, G.F.M. y KÜHN, E.R. (1987). Seasonal changes of the 5'-monodeiodination activity in kidney and skin homogenates of male *Rana ridibunda*: relation to plasma thyroxine (T<sub>4</sub>) and testosterone. *Gen. Comp. Endocrinol.* **68**: 163-169.

VANDORPE, G., KÜHN, E.R. y GEVAERTS, H. (1990). Failure to relate thyroid hormones and *in vitro* 5'-monodeiodination activity to oocyte development and sex steroids in the giant swamp frog *Dicoglossus occipitalis* at the equator. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**: 469-476.

VANECEK, J. y KLEIN, D.C. (1992). Melatonin inhibits gonadotropin-releasing hormone-induced elevation of intracellular Ca<sup>2+</sup> in neonatal rat pituitary cells. *Endocrinology* **130**: 701-707.

VASSART, G. y DUMONT, J.E. (1992). The thyrotropin receptor and the regulation of thyrocyte function and growth. *Endocr. Rev.* **13**: 596-611.

VERBURG-Van KEMENADE, B.M.L., JENKS, B.G., VISSER, T., TONON, M.C. y VAUDRY, H. (1987). Assessment of TRH as a potential MSH release stimulating factor in *Xenopus laevis*. *Peptides* **8**: 69-76.

VERSCHUEREN, C.P., SELMAN, P.J., MOL, J.A., VOS, J.H., van DIJK, J.E., SJOLLEMA, B.E. y de VIJLDER, J.J.M. (1991). Circulating thyroglobulin measurements by homologous radioimmunoassay in dogs with thyroid carcinoma. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **125**: 291-298.

VIJAYAN, M.M. y LEATHERLAND, J.F. (1989). Cortisol-induced changes in plasma glucose, protein, and thyroid hormone levels, and liver glycogen content of coho salmon (*Oncorhynchus kisutch* Walbaum). *Can. J. Zool.* **67**: 2746-2750.

VIJAYAN, M.M., FLETT, P.A. y LEATHERLAND, J.F. (1988). Effect of cortisol on the *in vitro* hepatic conversion of thyroxine to triiodothyronine in brook charr (*Salvelinus fontinalis*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **70**: 312-318.

VILLALBA, J.M., BURÓN, M.I., ROLDÁN, J.M. y NAVAS, P. (1993). Plasma membrane glycoproteins during anuran amphibian epidermal development. *Protoplasma* **172**: 136-144.

VILLALPANDO, I. y MERCHANT-LARIOS, H. (1990). Determination of the sensitive stages for gonadal sex-reversal in *Xenopus laevis* tadpoles. *Int. J. Dev. Biol.* **34**: 281-285.

VISSER, T.J. (1988). Metabolism of thyroid hormone. En: "Hormones and their Actions. Part I". B.A. Cooke, R.J.B. King, H.J. van der Molen (eds.). Elsevier Science Publishers BV. Cap. 6, pp. 81-103.

VIVIEN-ROELS, B. (1969). Etude du fonctionnement thyroïdien au cours du cycle saisonnier chez un reptile, *Pseudemys scripta elegans*. *Ann. Endocrinol. (Paris)* **30**: 383-391.

VIVIEN-ROELS, B. (1985). Interaction between photoperiod, temperature, pineal and seasonal reproduction in non-mammalian vertebrates. En: "The Pineal Gland, Current State of Pineal Research". B. Mess, C.S. Rúzsás, L. Tima, P. Pévet (eds.). Elsevier Publishers, New York. pp. 187-209.

VRIEND, J. (1983a). Evidence for pineal gland modulation of the neuroendocrine-thyroid axis. *Neuroendocrinology* **36**: 68-78.

VRIEND, J. (1983b). Pineal-thyroid interactions. *Pineal Res. Rev.* **1**: 183-206.

VRIEND, J., BERTALANFFY, F.D. y RALCEWICZ, T.A. (1987). The effects of melatonin and hypothyroidism on estradiol and gonadotropin levels in female syrian hamsters. *Biol. Reprod.* **36**: 719-728.

VRIEND, J., SHEPPARD, M.S. y BORER, K.T. (1990). Melatonin increases serum growth hormone and insulin-like growth factor I (IGF-I) levels in male syrian hamsters via hypothalamic neurotransmitters. *Growth Dev. Aging* **54**: 165-171.

WAKAHARA, M. (1994). Spermatogenesis is extraordinarily accelerated in metamorphosis-arrested larvae of a salamander, *Hynobius retardatus*. *Experientia* **50**: 94-98.

WALLACE, R.A. (1985). Vitellogenesis and oocyte growth in nonmammalian vertebrates. En: "Developmental Biology". L.W. Browder (ed.). Plenum Publishing Corporation. Vol. 1, pp. 127-177.

WANG, P.S., CHAO, H.T. y WANG, S.W. (1987). Interrelationship between estrogen and thyroxine on the release of luteinizing hormone and gonadotropin-releasing hormone *in vitro*. *J. steroid Biochem.* **28**: 691-696.

WANGH, L.J. y SCHNEIDER, W. (1982). Thyroid hormones are corequisites for estradiol-17 $\beta$  *in vitro* induction of *Xenopus* vitellogenin synthesis and secretion. *Dev. Biol.* **89**: 287-293.

WEBER, G.M., OKIMOTO, D.K., RICHMAN III, N.H. y GRAU, E.G. (1992). Patterns of thyroxine and triiodothyronine in serum and follicle-bound oocytes of the tilapia, *Oreochromis mossambicus*, during oogenesis. *Gen. Comp. Endocrinol.* **85**: 392-404.

WEBER, G.M., FARRAR, E.S., TOM, C.K.F. y GRAU, E.G. (1994). Changes in whole-body thyroxine and triiodothyronine concentrations and total content during early development and metamorphosis of the toad *Bufo marinus*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **94**: 62-71.



WEBER, P., KRAUSE, U., GAFFGA, G., BRABANT, G., MANZ, F., LEHNERT, H., SCHREZENMEIR, J. y BEYER, J. (1991). Unaltered pulsatile and circadian TSH release in euthyroid patients with endemic goitre. *Acta Endocrinol. (Copenh)* **124**: 386-390.

WEBLEY, G.E. y LUCK, M.R. (1986). Melatonin directly stimulates the secretion of progesterone by human and bovine granulosa cells *in vitro*. *J. Reprod. Fert.* **78**: 711-717.

WEEKE, J. y ØRSKOV, H. (1978). Evaluation of thyroid function. *Rec. Adv. Clin. Biochem.* **1**: 111-128.

WEIL, M.R. (1986). Changes in plasma thyroxine levels during and after spontaneous metamorphosis in a natural population of the green frog, *Rana clamitans*. *Gen. Comp. Endocrinol.* **62**: 8-12.

WENTWORTH, B.C. y RINGER, R.K. (1986). Thyroids. En: "Avian Physiology". P.D. Sturkie (ed.). Springer-Verlag, New York. 4ª Ed., Cap. 20, pp. 452-465.

WHITE, B.A. y NICOLL, C.S. (1981). Hormonal control of amphibian metamorphosis. En: "Metamorphosis: A Problem in Developmental Biology". L.I. Gilbert, E. Frieden (eds.). Plenum, New York/London. pp. 363-396.

WIECHMANN, A.F. (1986). Melatonin: parallels in pineal gland and retina. *Expl. Eye Res.* **42**: 507-527.

WIECHMANN, A.F. y WIRSIG-WIECHMANN, C.R. (1991). Localization and quantification of high-affinity melatonin binding sites in *Rana pipiens* retina. *J. Pineal Res.* **10**: 174-179.

WIECHMANN, A.F. y WIRSIG-WIECHMANN, C.R. (1993). Distribution of melatonin receptors in the brain of the frog *Rana pipiens* as revealed by *in vitro* autoradiography. *Neuroscience* **52**: 469-480.

WILLIAMS, L.M., MARTINOLI, M.G., TITCHENER, L.T. y PELLETIER, G. (1991). The ontogeny of central melatonin binding sites in the rat. *Endocrinology* **128**: 2083-2090.

WILLIAMSON, R.A. y DAVISON, T.F. (1987). Effects of increased circulating corticosterone on serum and thyroidal concentrations in iodothyronines and the responses to thyrotropin in the immature fowl (*Gallus domesticus*). *Gen. Comp. Endocrinol.* **65**: 65-72.

WITTKOWSKI, W.H., SCHULZE-BONHAGE, A.H. y BÖCKERS, T.M. (1992). The *pars tuberalis* of the hypophysis: a modulator of the *pars distalis*?. *Acta Endocrinol.* **126**: 285-290.

WOLLMUTH, L.P. y CRAWSHAW, L.I. (1988). The effect of development and season on temperature selection in bullfrog tadpoles. *Physiol. Zool.* **61**: 461-469.

WONG, C.C. y CHIU, K.W. (1987). Putative thyroid hormone receptors in red blood cells of some reptiles. *Gen. Comp. Endocrinol.* **66**: 433-440.

WONG, C.C., DÖHLER, K.D., ATKINSON, M.J., GEERLINGS, H., HESCH, R.D. y MÜHLEN, A. (1983). Influence of age, strain and season on diurnal periodicity of thyroid stimulating hormone, thyroxine, triiodothyronine and parathyroid hormone in the serum of male laboratory rats. *Acta Endocrinol. (Copenh.)* **102**: 377-385.

WONG, C.C., LAM, K.Y. y CHIU, K.W. (1993). The extrathyroidal conversion of T<sub>4</sub> to T<sub>3</sub> in the striped racer snake, *Elaphe taeniura*. *J. Comp. Physiol. B* **163**: 212-218.

WRIGHT, M.L., FRIM, E.K., BONAK, V.A. y BARIL, C. (1986). Metamorphic rate in *Rana pipiens* larvae treated with thyroxine or prolactin at different times in the light/dark cycle. *Gen. Comp. Endocrinol.* **63**: 51-61.

WRIGHT, M.L., JOREY, S.T., BLANCHARD, L.S. y BASSO, C.A. (1988a). Effect of a light pulse during the dark on photoperiodic regulation of the rate of thyroxine-induced, spontaneous, and prolactin-inhibited metamorphosis in *Rana pipiens* tadpoles. *J. Exp. Zool.* **247**: 99-108.

WRIGHT, M.L., JOREY, S.T., MYERS, Y.M., FIELDSTAD, M.L., PAQUETTE, C.M. y CLARK, M.B. (1988b). Influence of photoperiod, daylength, and feeding schedule on tadpole growth and development. *Develop. Growth & Differ.* **30**: 315-323.

WRIGHT, M.L., PATHAMMAVONG, N. y BASSO, C.A. (1990a). DNA synthesis is unaffected but subsequent cell division is delayed in tadpole hindlimb epidermis when thyroxine is given in the dark. *Gen. Comp. Endocrinol.* **79**: 89-94.

WRIGHT, M.L., BLANCHARD, L.S., JOREY, S.T., BASSO, C.A., MYERS, Y.M. y PAQUETTE, C.M. (1990b). Metamorphic rate as a function of the light/dark cycle in *Rana pipiens* larvae. *Comp. Biochem. Physiol.* **96A**: 215-220.

WRIGHT, M.L., CYKOWSKI, L.J., MAYRAND, S.M., BLANCHARD, L.S., KRASZEWSKA, A.A., GONZALES T., M. y PATNAUDE, M. (1991). Influence of melatonin on the rate of *Rana pipiens* tadpole metamorphosis *in vivo* and regression of thyroxine-treated tail tips *in vitro*. *Develop. Growth & Differ.* **33**: 243-249.

WRÓBEL, M., FRENDÓ, J. y CANNELLA, C. (1992). Seasonal changes in the activity of rhodanese in frog (*Rana temporaria*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **103B**: 469-472.

WRÓBEL, M. y FRENDÓ, J. (1993). Seasonal variation in the activity of 3-mercaptopyruvate sulphurtransferase of the frog (*Rana temporaria*) liver. *Comp. Biochem. Physiol.* **105B**: 91-95.

XU, Q., BAKER, B.S. y TATA, J.R. (1993). Developmental and hormonal regulation of the *Xenopus* liver-type arginase gene. *Eur. J. Biochem.* **211**: 891-898.

YAMADA, H., HORIUCHI, R., GEN, K., Y YAMAUCHI, K. (1993). Involvement of four hormones in thyroxine deiodination in several tissues of immature yearling masu salmon, *Oncorhynchus masou*. *Zool. Sci.* **10**: 587-596.

YAMAMOTO, K. y KIKUYAMA, S. (1982). Effects of prolactin antiserum on growth and resorption of tadpole tail. *Endocrinol. Japon.* **29**: 81-85.

YAMAMOTO, K., KIKUYAMA, S. y YASUMASU, I. (1979). Inhibition of thyroxine-induced resorption of tadpole tail by adenosine 3',5'-cyclic monophosphate. *Develop. Growth & Differ.* **21**: 255-261.

YAMAUCHI, K., HORIUCHI, R., KOYA, S. y TAKIKAWA, H. (1989). Uptake of 3,5,3'-L-triiodothyronine into bullfrog red blood cells mediated by plasma membrane binding sites. *Zool. Sci.* **6**: 749-755.

YAMAUCHI, K., KASAHARA, T., HAYASHI, H. y HORIUCHI, R. (1993). Purification and characterization of a 3,5,3'-L-triiodothyronine-specific binding protein from bullfrog tadpole plasma: a homolog of mammalian transthyretin. *Endocrinology* **132**: 2254-2261.

YAOITA, Y. y BROWN, D.D. (1990). A correlation of thyroid hormone receptor gene expression with amphibian metamorphosis. *Genes Dev.* **4**: 1917-1924.

YAOITA, Y., SHI, Y.B. y BROWN, D.D. (1990). *Xenopus laevis*  $\alpha$  and  $\beta$  thyroid hormone receptors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **87**: 7090-7094.

YONEYAMA, H., ISHII, S., YAMAMOTO, K. y KIKUYAMA, S. (1984). Plasma prolactin levels of *Bufo japonicus* before, during and after breeding in the pond. *Zool. Sci.* **1**: 969.

YOSHIZATO, K. y FRIEDEN, E. (1975). Increase in binding capacity for triiodothyronine in tadpole tail nuclei during metamorphosis. *Nature* **254**: 705-707.

YOSHIZATO, K., KISTLER, A. y FRIEDEN, E. (1975). Binding of thyroid hormones by nuclei of cells from bullfrog tadpole tail fins. *Endocrinology* **97**: 1030-1035.

YOUNGSON, A.F. McLAY, H.A. (1989). Thyroid hormone levels in flow-challenged adult salmon (*Salmo salar* L.). *Can. J. Zool.* **67**: 1851-1855.

YU, N.W., HSU, C.Y., KU, H.H., CHANG, L.T. y LIU, H.W. (1993). Gonadal differentiation and sexretions of estradiol and testosterone of the ovaries of *Rana catesbeiana* tadpoles treated with 4-hydroxyandrostenedione. *J. Exp. Zool.* **265**: 252-257.

ZACHMANN, A., ALI, M.A. y FALCÓN, J. (1992). Melatonin rhythms in the pineal organ of fishes and its effects: An overview. En: "Rhythms in Fishes". NATO ASI Series. M.A. Ali (ed.). Plenum Press, New York. Vol. A236, pp. 149-166.

ZAWILSKA, J.B. y NOWAK, J.Z. (1992). Regulatory mechanisms in melatonin biosynthesis in retina. *Neurochem. Int.* **20**: 23-36.

ZELIGS, J.D. y WOLLMAN, S.H. (1977). Ultrastructure of erythrophagocytosis and red blood cell fission by thyroid epithelial cells *in vivo*. *J. Ultrastruct. Res.* **59**: 57-69.

ZHOU, Y., SAMSON, M., FRANCON, J. y BLONDEAU, J.-P. (1992). Thyroid hormone concentrative uptake in rat erythrocytes. *Biochem. J.* **281**: 81-86.